



Daniela Santos Tavares

AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA
DE *SALMONELLA* SPP. E MICRORGANISMOS
INDICADORES DE HIGIENE EM CARCAÇAS DE
SUÍNOS

Orientador: Susana Dias

Coimbra, 2019

Daniela Santos Tavares

AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE *SALMONELLA* SPP. E MICRORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE EM CARCAÇAS DE SUÍNOS

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior
Agrária de Coimbra para cumprimento dos requisitos
necessários à obtenção do grau de mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Susana Dias

Coimbra, 2019

AGRADECIMENTOS

É este o momento de deixar aqui expressa a minha gratidão a todos os que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Quero agradecer à minha orientadora interna, Professora Doutora Susana Dias por todo o apoio técnico prestado, toda a disponibilidade e ajuda ao longo da elaboração deste trabalho.

Ao meu orientador externo Dr. Marco Gonçalves pela disponibilidade prestada e pela cooperação tanto durante a realização do estágio como durante a elaboração deste trabalho.

Àqueles amigos que nos dão palavras de coragem e que lutam para nos ver felizes, Alexandre, Adriana, Catarina, Keily e Mauro, um enorme obrigada.

Por último, e tendo consciência que sozinha nada disto teria sido possível, dirijo um agradecimento especial aos meus pais, pelo apoio incondicional, incentivo, amizade e paciência demonstrados e total ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo. A eles dedico este trabalho!

Agradeço ainda, a todos aqueles que não mencionei e que de alguma maneira também foram importantes pela sua presença e prestabilidade ao longo do curso.

A TODOS MUITÍSSIMO OBRIGADA!

RESUMO

As bactérias do género *Salmonella* spp. são responsáveis por infeções em suínos e em seres humanos, influenciando assim a produção de carne e também a saúde pública.

O presente estudo teve como objetivo mapear a distribuição da contaminação microbiológica, em particular no que respeita a indicadores de higiene e *Salmonella* spp., em carcaças de suínos e avaliar e estabelecer uma correlação, no sentido de poder usar a quantificação de aeróbios totais a 30°C e *Enterobacteriaceae*, como indicadores fiáveis da presença de *Salmonella* spp., com o intuito de evitar/reduzir as análises morosas e dispendiosas de pesquisa deste patógeno.

Com este propósito foram utilizados dados compreendidos entre o dia 20 de junho de 2017 e 10 de junho de 2019. Neste período de tempo foram analisadas 525 amostras pertencentes a um matadouro no distrito de Coimbra, recolhidas no corredor de expedição, antes da refrigeração. Em todas as amostras, foi pesquisada a presença de *Salmonella* spp. e quantificados os aeróbios totais a 30°C e *Enterobacteriaceae*.

Relativamente à quantificação de *Enterobacteriaceae*, foram determinados valores entre 0,70 Log₁₀ ufc/cm² e 4,32 Log₁₀ ufc/cm², com uma média de 1,72 ± 0,72 Log₁₀ ufc/cm². Na quantificação de aeróbios totais, os valores variaram entre 0,90 Log₁₀ ufc/cm² e 5,88 Log₁₀ ufc/cm², com um valor médio de 3,33 ± 0,66 Log₁₀ ufc/cm².

No que concerne a *Salmonella* spp., do total de amostras analisadas, esta foi detetada em apenas 42 amostras, as quais apresentaram valores de indicadores de higiene de diversas ordens de grandeza. Desta forma, não foi possível estabelecer estatisticamente uma correlação positiva entre a contagem de indicadores de higiene e a presença de *Salmonella* spp., como se procurou inicialmente com este estudo.

Palavras-chave: Carcaças de suínos, *Enterobacteriaceae*, Indicadores de Higiene, *Salmonella*

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Salmonella* spp. are responsible for infections in pigs and humans, thus influencing meat production and also public health.

The present study aimed to map the distribution of microbiological contamination, in particular concerning hygiene indicators and *Salmonella* spp., in pig carcasses and to evaluate and establish a correlation in order to use the total aerobic bacteria at 30 °C and *Enterobacteriaceae* as reliable indicators of the presence of *Salmonella* spp., in order to avoid/reduce the time consuming and expensive analysis of this pathogen.

For this purpose, data were used between June 20, 2017 and June 10, 2019. During this period, 525 samples belonging to a slaughterhouse in the district of Coimbra, collected in the expedition corridor, before refrigeration were analyzed. In all samples, the presence of *Salmonella* spp. was investigated and total aerobic bacteria at 30 °C and *Enterobacteriaceae* were quantified.

Regarding the quantification of *Enterobacteriaceae*, it presented values between 0.70 Log₁₀cfu/cm² and 4.32 Log₁₀cfu/cm², with an average of 1.72 ± 0.72 Log₁₀cfu/cm², for the total aerobic quantification, the values ranged from 0.90 Log₁₀cfu/cm² to 5.88 Log₁₀cfu/cm², with an average value of 3.33 ± 0.66 Log₁₀cfu/cm².

As far as *Salmonella* spp. is concerned, out of the total samples analyzed, it was detected in only 42 samples, which presented hygiene indicator values of several orders of magnitude. Thus, it was not possible to statistically establish a positive correlation between the hygiene indicator count and the presence of *Salmonella* spp., as initially sought with this study.

Key words: *Enterobacteriaceae*, Hygiene Indicators, pig carcasses, *Salmonella*

ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Índice de tabelas.....	vii
Índice de figuras.....	viii
Lista de abreviaturas.....	x
1. Introdução.....	1
2. A empresa	4
2.1. Processo de acreditação	4
3. Doenças de origem alimentar.....	8
3.1. Doenças de origem alimentar em Portugal	9
3.2. Doenças de origem alimentar na União Europeia atribuídas a <i>Salmonella</i> spp..	11
3.2.1. Casos humanos de salmonelose em Portugal.....	13
4. Características das bactérias do género <i>Salmonella</i>	15
5. Microrganismos indicadores.....	18
5.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	19
5.2. Aeróbios totais a 30°C	21
6. Material e Métodos	22
6.1. Técnicas de amostragem.....	22
6.1.1. Método de excisão	22
6.1.2. Método por “esfregaço”	23
6.1.3. Armazenamento e transporte das amostras.....	25
6.2. Análises microbiológicas das amostras.....	25
6.2.1. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	25

6.2.1.1. Fundamento da metodologia aplicada na pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	25
6.2.1.2. Preparação das soluções e meios de cultura para a pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	27
6.2.1.3. Execução da análise – Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	28
6.2.1.4. Expressão dos resultados de acordo com os critérios – Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	29
6.2.2. Quantificação de <i>Enterobacteriaceae</i>	30
6.2.2.1. Fundamento da metodologia aplicada na quantificação de <i>Enterobacteriaceae</i>	30
6.2.2.2. Preparação das soluções e meios de cultura para a quantificação de <i>Enterobacteriaceae</i>	31
6.2.2.3. Execução da análise - Quantificação de <i>Enterobacteriaceae</i>	32
6.2.2.4. Expressão dos resultados de acordo com os critérios – Quantificação de <i>Enterobacteriaceae</i>	33
6.2.3. Contagem de aeróbios totais a 30°C	34
6.2.3.1. Fundamento da metodologia aplicada na contagem de aeróbios totais a 30°C	34
6.2.3.2. Preparação das soluções e meios de cultura para a contagem de aeróbios totais a 30°C	35
6.2.3.3. Execução da análise - Quantificação de aeróbios totais a 30°C	35
6.2.3.4. Expressão dos resultados de acordo com os critérios – Quantificação de aeróbios totais a 30°C	36
7. Resultados e Discussão	38
7.1. Apresentação e discussão dos resultados	38
7.1.1. Relação entre a quantidade de <i>Enterobacteriaceae</i> e a pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	40

7.1.2. Relação entre a quantidade de aeróbios totais a 30°C e a pesquisa de Salmonella spp.....	42
8. Considerações finais	46
9. Bibliografia	48
10. Anexos.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Patógenos mais comuns em alimentos (Adaptado de Alves, 2012)	9
Tabela 2. Surtos investigados pelo INSA nos quais foi identificado o agente causal, 2012-2016 (FONTE: Adaptado de INSA, 2018 e INSA, 2019)	10
Tabela 3. Critérios de higiene dos processos relativos a carcaças de suínos para <i>Salmonella</i> spp. (Fonte: Regulamento (CE) nº 217/2014)	30
Tabela 4. Critérios de higiene dos processos relativos a carcaças de suínos para <i>Enterobacteriaceae</i> (Fonte: Regulamento (CE) nº 1441/2007)	34
Tabela 5. Critérios de higiene dos processos relativos a carcaças de suínos para o número de aeróbios totais a 30°C (Fonte: Regulamento (CE) nº 1441/2007)	36
Tabela 6. Resumo dos resultados de quantificação dos Indicadores de Higiene nas amostras analisadas ($n=525$)	39
Tabela 7. Média e Desvio-padrão da contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> para a pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	42
Tabela 8. Média e Desvio-padrão da contagem de aeróbios totais a 30°C para a pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	44
Tabela 9. Amostras de carcaças de suínos provenientes de um matadouro no distrito de Coimbra.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de acreditação (FONTE: IPAC, (s/d))	6
Figura 2. Casos humanos de salmonelose relatados entre 2013-2017 (Adaptado de EFSA, 2018)	12
Figura 3. Casos humanos de salmonelose relatados entre 2008-2017 (Adaptado de EFSA, 2014 e EFSA, 2018).....	12
Figura 4. Número de casos confirmados de salmonelose atribuídos a <i>Salmonella</i> spp. em Portugal no período 2013-2017(FONTE: Adaptado de EFSA, 2018)	13
Figura 5. Número de casos confirmados de salmonelose atribuídos a <i>Salmonella</i> spp. em Portugal no período 2008-2017(FONTE: Adaptado de EFSA, 2014 e EFSA, 2018)...	13
Figura 6. Relação ideal entre um microrganismo indicador e o patogénico associado (Adaptado de James et al., 2005)	19
Figura 7. Relação entre os géneros dentro das <i>Enterobacteriaceae</i> e aqueles pertencentes ao grupo dos coliformes (Adaptado de FSANZ, 2018).	20
Figura 8. Método de excisão em carcaça	23
Figura 9. Exemplos de locais de amostragem.....	24
Figura 10. Esfregaço em carcaça com esponja abrasiva.....	25
Figura 11. Placa de Petri com resultado positivo para a presença de <i>Salmonella</i> spp. em meio RAPID' <i>Salmonella</i> Agar (FONTE: Osborne N, 2014)	27
Figura 12. Diagrama resumo da metodologia para a pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	29
Figura 13. Placa de Petri com colónias de <i>Enterobacteriaceae</i> no meio RAPID'Enterobactereaceae (FONTE: Bio-Rad, s/d).....	31
Figura 14. Diagrama resumo da metodologia para a quantificação de <i>Enterobacteriaceae</i>	32
Figura 15. Diagrama resumo da metodologia para a contagem de aeróbios totais a 30°C.....	36
Figura 16. Relação entre o número de amostras analisadas e a pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	38
Figura 17. Frequência dos resultados globais de todas as amostras para <i>Enterobacteriaceae</i>	39

Figura 18. Frequência dos resultados globais de todas as amostras para aeróbios totais a 30°C	40
Figura 19. Frequência dos resultados para a pesquisa de Salmonella spp. em função da contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	41
Figura 20. Diagrama de caixa para a pesquisa de Salmonella spp em função da contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	42
Figura 21. Frequência dos resultados para a pesquisa de Salmonella spp em função da contagem de aeróbios totais a 30°C	43
Figura 22. Diagrama de caixa para a pesquisa de Salmonella spp em função da contagem de aeróbios totais a 30°C	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AESA Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

AFNOR *Association Française de Normalisation*

AOAC *Association of official analytical chemists*

APHA *American Public Health Association*

DOA Doenças de Origem Alimentar

ECDC *European Centre for Disease Prevention and Control*

EFSA *European Food Safety Authority*

EM Estados Membros

ICMSF *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*

ILAC *International Laboratory Accreditation Cooperation*

INSA Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

IPAC Instituto Português de Acreditação

ISO *International Organization for Standardization*

OMS Organização Mundial da Saúde

PCA Plate Count Agar

UE União Europeia

UFC Unidades formadoras de colónias

YOPI *Young, Old, Pregnant and Immunocompromised*

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos tempos, o conceito de Segurança Alimentar evoluiu lado a lado com a evolução do homem, da alimentação humana e da Ciência. Este conceito implica a garantia de que os géneros alimentícios ingeridos pelo homem não irão causar danos à sua saúde. Esta visão acarreta que os alimentos sejam controlados ao longo de toda a cadeia alimentar, “do prado ao prato”, ou seja, desde a exploração primária e a produção de alimentos até à venda ou fornecimento de géneros alimentícios, uma vez que cada etapa pode ter repercussões nessa segurança (Cordeiro, 2014).

A carne de porco é uma das carnes mais consumidas do mundo, com evidências de pecuária suína que datam de 5000 a.C.. Na União Europeia produz-se 17,8 milhões de toneladas de carne de porco por ano, detendo o segundo lugar a nível mundial, depois da China. A maior produção de suínos em Portugal encontra-se na região de Lisboa e Vale do Tejo (Carreira, 2011).

A carne e os seus derivados têm sido frequentemente implicados como veículos de transmissão de patógenos para os seres humanos. A *Salmonella* spp., entre outras bactérias patogénicas, presentes na superfície das carcaças de suínos, entram no matadouro a partir dos animais vivos e dos operadores. Segundo Lima *et al.* (2004), a *Salmonella* spp. destaca-se como a principal bactéria patogénica incorporada na linha de abate pelo próprio suíno.

Durante o processo de abate, várias partes do corpo do porco altamente contaminadas são abertas (por exemplo, cavidade oral) ou removidas (por exemplo, intestinos e amígdalas), o que envolve um considerável risco de disseminação bacteriana desses tecidos, para a carcaça do suíno e para o meio ambiente. Vários estudos têm demonstrado uma alta presença de *Salmonella* spp. em amígdalas palatinas, cavidades orais e intestinos de suínos no momento do abate. Além disso, a desinfecção insuficiente de facas de corte ou máquinas pode levar à contaminação cruzada de uma carcaça para outra (Biasino *et al.*, 2017).

Thorberg *et al.* (2001) relataram que os processos particularmente envolvidos no risco de contaminação por *Salmonella* spp. durante o processo de abate dos suínos são a evisceração e as instalações sanitárias, contudo o escaldão e a divisão da carcaça também se destacam por promover o aumento do número da contaminação

bacteriana no final da linha do abate. As fezes e os gânglios linfáticos dos suínos são uma importante fonte de contaminação das carcaças nas etapas de abate.

O controlo, sobretudo da *Salmonella* spp., em etapas anteriores ao abate, incluindo o transporte e o sistema de criação é de extrema importância. A quantidade de *Salmonella* spp. na superfície da carcaça de suínos pode ser reduzido com a adoção de procedimentos adequados de abate, tais como escaldão individual, remoção cuidadosa dos intestinos e a descontaminação após o abate (Lima *et al.*, 2004).

O abate e a preparação das carcaças de suínos, é assim, um processo complexo com elevado risco de contaminação microbiana representando um risco para a saúde humana (Biasino *et al.*, 2017), sendo as infeções por *Salmonella* spp. uma das principais causas de doença gastrointestinal em seres humanos, com 56,8% dos casos de salmonelose relatados relacionados ao consumo de carne suína (EFSA, 2012).

O controlo da contaminação microbiológica das carcaças, nomeadamente ao nível da contagem total de aeróbios e da pesquisa de patógenos, como a *Salmonella* spp., é de extrema importância quando se pretende equacionar a segurança dos géneros alimentícios segundo uma abordagem preventiva (Castelo, 2008).

De acordo com o Regulamento (CE) nº 1441/2007, os operadores dos matadouros ou de empresas que produzam carne picada, preparados de carne ou carne separada mecanicamente devem colher amostras para análise microbiológica pelo menos uma vez por semana. O dia da amostragem deve variar todas as semanas no sentido de assegurar que sejam abrangidos todos os dias da semana.

No que respeita à amostragem de carcaças para análise de *Enterobacteriaceae* e determinação do número de colónias aeróbias, no mesmo Regulamento é referido que a frequência pode ser reduzida para testes quinzenais caso se obtenham resultados satisfatórios durante seis semanas consecutivas. No caso da amostragem de carcaças para análise de *Salmonella* spp., a frequência de amostragem pode ser reduzida para testes quinzenais caso se obtenham resultados satisfatórios durante 30 semanas consecutivas. A frequência da amostragem para a análise de *Salmonella* spp. pode também ser reduzida no caso de existir um programa nacional ou regional de controlo de *Salmonella* spp., desde que este programa preveja a realização de testes que substituam a amostragem acima descrita. A frequência da amostragem pode ser

ainda mais reduzida se o programa nacional ou regional de controlo de *Salmonella* spp. demonstrar que a prevalência deste género bacteriano é baixo nos animais adquiridos pelo matadouro.

No entanto, os pequenos matadouros podem ser isentados da aplicação destas frequências de amostragem, se tal se justificar e for autorizado pela autoridade competente, na sequência de uma análise dos riscos.

Neste contexto de avaliação microbiológica de carcaças de suínos, pretendeu-se com o presente estudo, desenvolvido no âmbito do estágio de mestrado, mapear a distribuição da contaminação em particular no que respeita a indicadores de higiene e *Salmonella* spp., e estabelecer uma correlação entre estes, no sentido de poder usar a quantidade de aeróbios totais a 30°C e *Enterobacteriaceae*, como indicadores fiáveis da presença de *Salmonella* spp., contribuindo assim, para reduzir a necessidade de efetuar as análises microbiológicas de pesquisa, dispendiosas e morosas.

2. A EMPRESA

O laboratório onde decorreu o estágio, A3 - Análises, Águas e Alimentos, Lda realiza ensaios microbiológicos e físico-químicos em águas, alimentos, cosméticos e outros, presta também serviço de consultoria nas áreas da Segurança Alimentar e referenciais normativos, como por exemplo ISO 22000, IFS, ISO 9001. No laboratório trabalham 10 pessoas, distribuídas por diferentes áreas, desde análises físico-químicas, microbiológicas, amostragem, contabilidade e consultoria.

O laboratório está acreditado, de acordo com a NP EN ISO/IEC 17025 pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), garantindo o cumprimento dos requisitos da NP EN ISO/IEC 17025, de forma a implementar e manter um sistema de gestão da qualidade, reconhecendo as competências técnicas de um sistema de gestão de laboratório confiável e eficiente. Esta acreditação reconhece a competência técnica do, A3 - Análises, Águas e Alimentos, Lda para executar ensaios cumprindo requisitos estruturais, técnicos e de sistemas de gestão, de modo a garantir a fiabilidade dos resultados obtidos.

2.1. Processo de acreditação

A acreditação consiste na avaliação e reconhecimento da competência técnica de entidades, através de uma avaliação efetuada por um Organismo de Acreditação, para efetuar atividades específicas de avaliação da conformidade (por exemplo, ensaios, calibrações, certificações e inspeções). No caso dos laboratórios, em efetuar ensaios ou calibrações. Em Portugal o organismo de acreditação é o IPAC (IPAC, s/).

Este processo de acreditação começa pela apresentação de uma candidatura por parte da entidade em questão, neste caso, do laboratório, onde este deve preencher e enviar ao IPAC os formulários correspondentes à atividade técnica que pretende desempenhar. A candidatura é então analisada pelo IPAC, de forma a verificar se os dados se encontram completos e se pode ser dada sequência (IPAC, s/d).

Durante a fase de avaliação o IPAC nomeia a Equipa Avaliadora, a qual estuda a documentação e procede à avaliação. Após a avaliação, é emitido um Relatório, identificando as deficiências a serem corrigidas, de modo a demonstrar o cumprimento

das normas de acreditação. Posteriormente, após a resposta do laboratório, a Equipe Avaliadora emite um parecer, onde é tomada uma decisão, favorável ou não, pelo IPAC (IPAC, s/d).

Após a acreditação ter sido concedida, o IPAC programará a realização de avaliações periódicas ao laboratório, para confirmar o cumprimento continuado das condições de acreditação. Durante um ciclo de acreditação, todo o âmbito acreditado e instalações abrangidas têm de ser avaliadas, sendo estabelecida pelo IPAC a programação das avaliações de acompanhamento e de renovação em conformidade. O laboratório deve enviar ao IPAC toda a documentação solicitada para a respetiva preparação, para que seja rececionada com a antecedência de pelo menos 1 mês relativamente ao mês de realização da avaliação. Poderá na fase de manutenção ser acordado com o laboratório, ou disposto em esquema de acreditação específico, a realização de avaliações sem aviso prévio ou de curto prazo, devendo então ser solicitada a documentação e definição do âmbito de avaliação no início de cada ano, ou conforme seja acordado (IPAC, 2017).

O Estatuto de Entidade Acreditada implica que a qualquer momento seja demonstrado o cumprimento dos critérios de acreditação aplicáveis. Assim, o IPAC poderá solicitar a qualquer momento que a laboratório forneça informações, documentos, registos ou evidências que evidenciem a realização, de forma competente, das atividades abrangidas pelo âmbito acreditado ou do cumprimento de requisitos, bem como informações sobre alterações consideradas relevantes (IPAC, 2017).

Caso se verifique que a Entidade Acreditada não consegue cumprir os critérios de acreditação ou o presente Regulamento e disposições por ele referenciadas, é aplicada uma suspensão temporária. Esta também pode ser aplicada em virtude de atos ou omissões lesivas da imagem do IPAC e do Estatuto de Entidade Acreditada. A suspensão da acreditação pode ser total ou parcial relativamente ao âmbito de acreditação e consoante a gravidade (IPAC, 2017).

O IPAC poderá também proceder ao término das relações contratuais com a Entidade Acreditada e conseqüente retirada do Estatuto de Entidade Acreditada e do direito ao uso dos Símbolos de Acreditação.

O IPAC pode anular a acreditação em caso de:

- Impossibilidade continuada ou prolongada de cumprimento dos critérios e obrigações de acreditação;
- Falência ou insolvência da Entidade;
- Condenação judicial por atos que afetem a idoneidade e competência face à acreditação;
- Atos ou omissões lesivas da imagem do IPAC e do Estatuto de Entidade Acreditada.

O processo de acreditação encontra-se resumido na Figura 1.

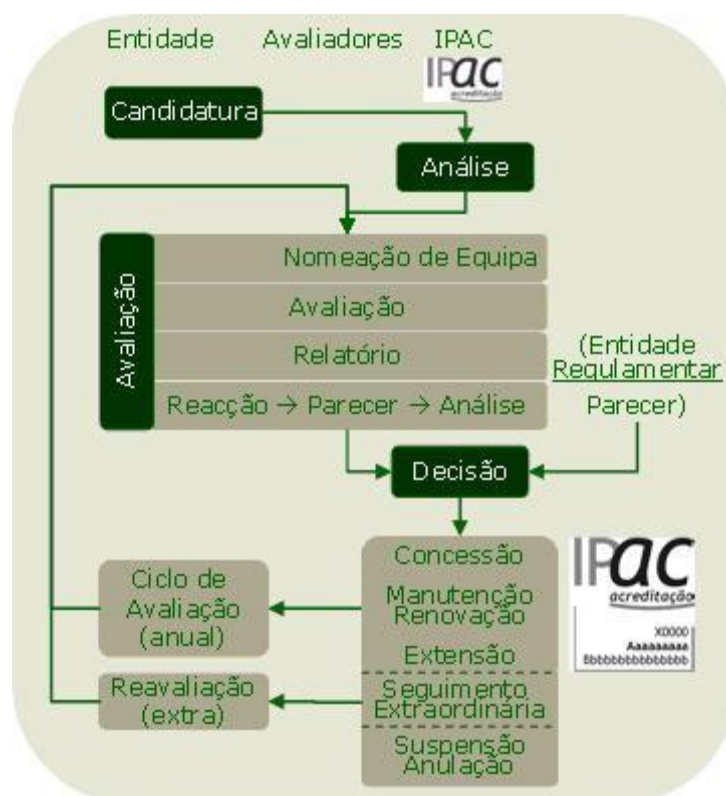


Figura 1. Processo de acreditação (FONTE: IPAC, (s/d))

Segundo a ILAC-International Laboratory Accreditation Cooperation (2010) a acreditação de laboratórios oferece reconhecimento formal a laboratórios competentes, proporcionando assim um meio rápido para os clientes identificarem e selecionarem serviços de ensaio, medição e calibração confiáveis. Geralmente, os laboratórios acreditados emitem relatórios de ensaio ou calibração que trazem o símbolo do organismo de acreditação, como uma indicação da sua acreditação.

A acreditação de um laboratório não é uma certificação, como muitas vezes é considerado (por exemplo, certificação de sistemas de gestão da qualidade ISO 9001). Uma diferença fundamental é que a acreditação, normalmente, é um requisito legal para o exercício de determinada atividade de avaliação da conformidade, ao contrário da certificação que é maioritariamente uma opção voluntária das empresas. No entanto existem requisitos em comum entre a norma de referência da acreditação de laboratórios, norma NP EN ISO/IEC 17025 e a norma ISO 9001 que tem servido de base para o desenvolvimento das normas de sistemas de gestão e respetiva certificação de empresas. Essa foi a preocupação dos organismos de normalização.

A conformidade do sistema de gestão da qualidade de um laboratório com os requisitos da ISO 9001 não é suficiente para demonstrar a sua competência técnica na realização de ensaios ou calibrações. Assim como a conformidade com os requisitos da NP EN ISO/IEC 17025 não implica a conformidade com todos os requisitos da ISO 9001.

A norma NP EN ISO/IEC 17025 está dividida em duas grandes partes, Secção 4 - Requisitos de Gestão e Secção 5 – Requisitos Técnicos. Esta última é a que causa normalmente mais dificuldades na implementação, relacionadas com a capacidade dos laboratórios cumprirem totalmente com os requisitos das normas e legislação específicas aplicáveis à realização de cada tipo de ensaio ou calibração (métodos de ensaio ou calibração, estimativas da incerteza de medição, etc.).

Esta norma NP EN ISO/IEC 17025:2017 define uma metodologia harmonizada, com validade para a acreditação em Portugal, na Europa e internacionalmente já que existem acordos de reconhecimento mútuo entre os organismos de acreditação, facilitando assim a internacionalização das empresas.

O anexo técnico de acreditação do laboratório, encontra-se disponibilizado no site do mesmo (<https://www.a3lab.com/laboratorio/acreditacao>).

3. DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR

As doenças de origem alimentar (DOA) constituem um grupo de patologias que se definem como "qualquer entidade nosológica de natureza infecciosa ou tóxica que seja causada pelo consumo de alimentos ou água". Associam-se maioritariamente a um conjunto de sintomas como vômitos, diarreia, náuseas, dores abdominais, sendo vulgarmente conhecidas por gastroenterites ou doenças diarreicas. A razão pela qual surgem estes sintomas prende-se com o funcionamento do nosso organismo, uma vez que ocorrem quando as funções do aparelho gastrointestinal são perturbadas (Soares, 2007).

As DOA podem ser provocadas por mais de 250 tipos de bactérias, fungos ou vírus. Especialmente as que são provocadas por patógenos, constituem um problema de saúde pública cuja magnitude é elevada, embora o conhecimento da situação seja inferior à realidade. Este fenómeno é comum a todos os países, incluindo os mais desenvolvidos, já que este tipo de doenças surge sob as mais diversas formas, desde ligeiras indisposições até situações mais graves, que podem carecer de cuidados hospitalares ou mesmo causar a morte. Muitos desses microrganismos vivem naturalmente no ambiente onde os alimentos são produzidos, podendo ser eliminados pela temperatura elevada durante o cozimento do alimento e também pelas boas práticas de higiene. Na Tabela 1, são apresentados alguns exemplos de alimentos, bem como os principais patógenos que neles podem ser encontrados.

As bactérias são os microrganismos que mais contaminam os alimentos. Elas multiplicam-se rapidamente caso encontrem um ambiente favorável, nutrientes abundantes, temperatura adequada, além de humidade, concentração de oxigénio e pH adequados. Em países desenvolvidos, as bactérias patogénicas mais comuns em doenças alimentares são: *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp., sendo que as duas últimas estão associadas a doenças graves (Alves, 2012).

Tabela 1. Patógenos mais comuns em alimentos (Adaptado de Alves, 2012)

Alimentos	Exemplos de patógenos
Frutos do mar crus	<i>Vibrio</i> spp., Vírus Hepatite A, Norovírus
Ovos crus	<i>Salmonella</i> spp.
Carnes pouco cozinhadas	<i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>
Leite ou sumos não pasteurizados	<i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Escherichia coli</i>
Queijos moles não pasteurizados	<i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i>
Conservas caseiras	<i>Clostridium botulinum</i>
Salsichas, fiambre, etc.	<i>Listeria monocytogenes</i>

Os principais fatores que contribuem para a ocorrência de doenças infecciosas de origem alimentar continuam a ser as contaminações cruzadas devido a manipulações inadequadas, preparações efetuadas com antecedência e armazenamento prolongado à temperatura ambiente, cozedura/processamento térmico inadequados e manipuladores infetados (Cunha *et al.*, 2007).

3.1. Doenças de origem alimentar em Portugal

Em Portugal não existe um sistema de vigilância epidemiológica implementado e, por consequência, os dados existentes relativos a DOA são muito escassos, não revelando a verdadeira dimensão do problema no país. Os dados que têm sido publicados internacionalmente nos relatórios da EFSA (European Food Safety Authority) e anteriormente nos relatórios da OMS (Organização Mundial da Saúde), foram apenas os que chegaram ao conhecimento dos laboratórios de Microbiologia dos Alimentos do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, IP). A partir de 2004 todos os dados que chegam ao INSA são publicados nos relatórios da EFSA.

Na Tabela 2 pode observar-se o número de surtos investigados laboratorialmente com agente causal identificado que ocorreram entre 2012 e 2017, evidenciando-se o número de casos de doença, hospitalizações e óbitos reportados.

Tabela 2. Surtos investigados pelo INSA nos quais foi identificado o agente causal, 2012 -2016 (FONTE: Adaptado de INSA, 2018 e INSA, 2019)

	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Total
Nº de surtos	7	10	13	20	17	18	85
Nº de casos humanos	135	183	589	421	487	323	2138
Nº de hospitalizados	1	17	56	96	66	145	381
Nº de óbitos	0	0	0	0	0	0	0

No contexto dos surtos investigados em 2017, o agente causal foi identificado em 72% (13/18) dos surtos, sendo os agentes causais mais frequentemente implicados as “Toxinas/Bactérias produtoras de toxinas”, correspondendo a 67% (12/18) do número total de surtos, seguidos de “Vírus” em 5% (1/18) dos surtos, não tendo sido possível identificar o agente em 28% (5/18) dos surtos.

Ainda segundo os dados compilados e analisados pelo Instituto Ricardo Jorge, os agentes causais identificados em mais de metade dos surtos reportados foram: *Bacillus cereus* e/ou suas toxinas (5 surtos), Enterotoxinas estafilocócicas/*Estafilococcus coagulase positiva* (3 surtos), *Clostridium perfringens* (3 surtos), Toxina botulínica tipo B (1 surto) e Norovírus GII (1 surto). Dos 13 surtos confirmados por isolamento do agente etiológico causal, em 12 foi possível a deteção nos géneros alimentícios e em 1 a deteção só foi possível em amostras biológicas de doentes. Os autores deste estudo salientaram como principais fatores associados à ocorrência destes 13 surtos, em que o agente causal foi identificado, a contaminação cruzada e o incumprimento das boas práticas de tempo e temperatura após preparação (INSA, 2019).

3.2. Doenças de origem alimentar na União Europeia atribuídas a *Salmonella* spp.

Anualmente a EFSA e o ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) publicam um relatório sobre a ocorrência de zoonoses e DOA na União Europeia, através da compilação e análise dos dados enviados pelos Estados Membros (EM). Um dos principais objetivos da EFSA é contribuir para a avaliação do risco e prevenir a incidência de DOA, através da identificação dos géneros alimentícios responsáveis, assim como dos fatores que contribuem para a ocorrência destas situações.

A análise dos relatórios permite verificar que a campilobacteriose é a zoonose mais frequente a nível da UE, seguida da salmonelose (EFSA, 2018).

Em 2017, foram relatados 91 662 casos humanos de salmonelose, 16 796 hospitalizações e 156 casos mortais. Durante os últimos 5 anos (2013–2017), a tendência geral não apresentou qualquer aumento ou diminuição estatisticamente significativa, como é observado na Figura 2. Sete EM relataram uma tendência crescente (como é o caso de Portugal) e quatro EM uma tendência decrescente durante o período 2013-2017 (EFSA, 2018).

Os cinco serovares mais frequentemente reportados em casos humanos adquiridos na UE em 2017 foram, por ordem decrescente: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* monofásico, *S. Infantis* e *S. Newport*. A proporção de doenças por salmonelose humana devido a *S. Enteritidis* continuou a aumentar em 2017. Isto deveu-se principalmente a um grande número de EM que começaram a reportar dados de serovar. Os dados reportados em alimentos e animais mostraram que *S. Enteritidis* estava principalmente associado a galinhas poedeiras e, em seguida, à carne de frango. As doenças por salmonelose em humanos devido a *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* monofásico e *S. Infantis* diminuíram em comparação com 2016, enquanto permaneceram inalteradas para *S. Newport*. *S. Typhimurium* foi isolado de quase todas as fontes de alimentos para animais. Para as variantes monofásicas de *S. Typhimurium*, foi confirmada uma forte associação com a cadeia suína. Finalmente, *S. Infantis* foi associado a frangos de corte e carne e *S. Newport* foi associado a fontes de peru e frangos.

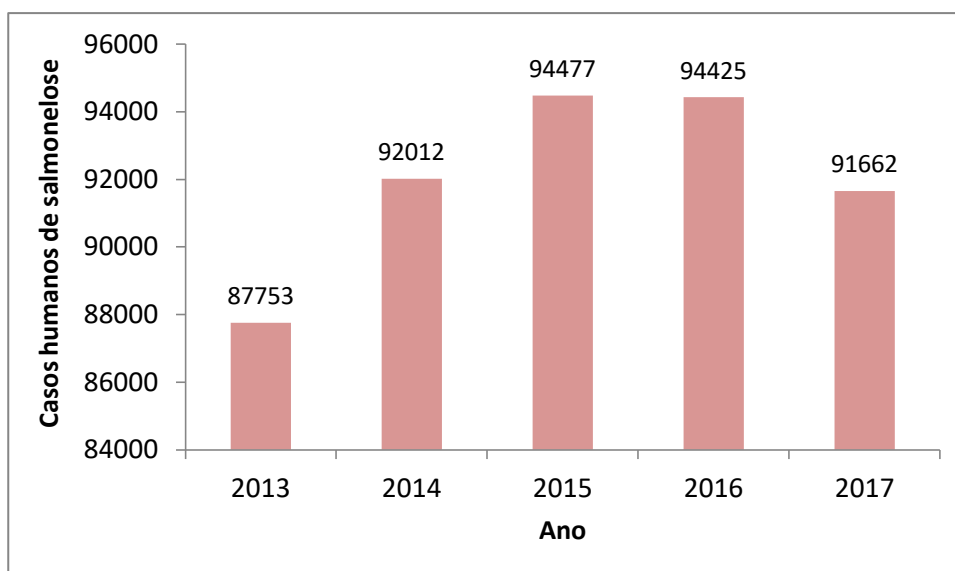


Figura 2. Casos humanos de salmonelose relatados entre 2013-2017 (Adaptado de EFSA, 2018)

No entanto, se alargarmos o intervalo de tempo para 10 anos (2008-2017), verifica-se que a tendência decrescente que começou em 2008, tem vindo a estagnar nos últimos anos, como se pode observar na Figura 3.

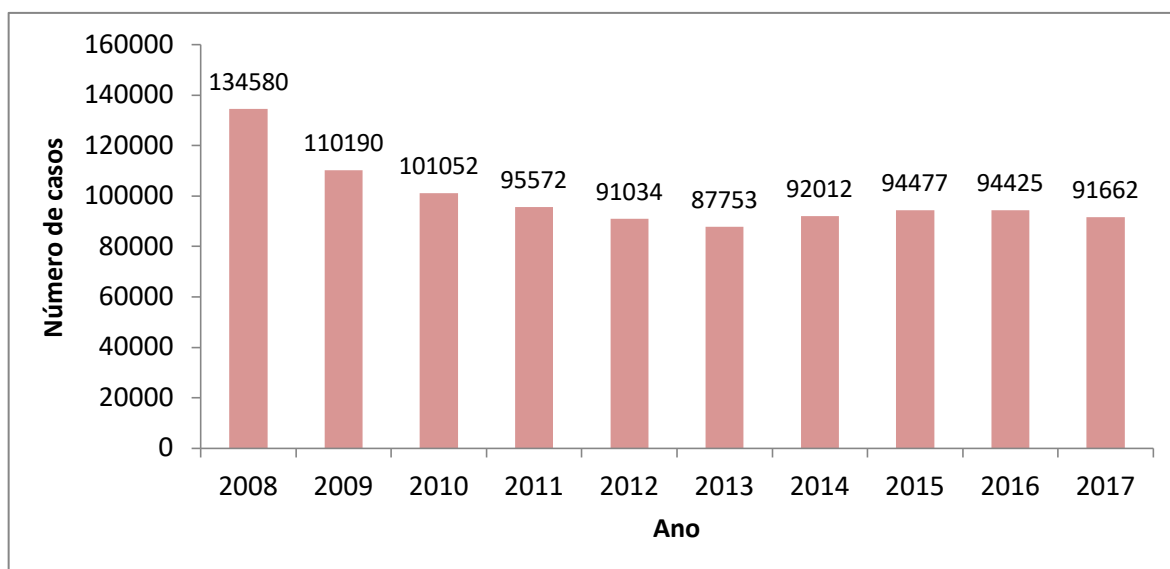


Figura 3. Casos humanos de salmonelose relatados entre 2008-2017 (Adaptado de EFSA, 2014 e EFSA, 2018)

3.2.1. Casos humanos de salmonelose em Portugal

Segundo os relatórios da EFSA, os casos confirmados de salmonelose ocorridos em Portugal no período 2013-2017 foram 1574. Na Figura 4 pode ser observada a existência de uma tendência crescente dos casos humanos de salmonelose em Portugal.

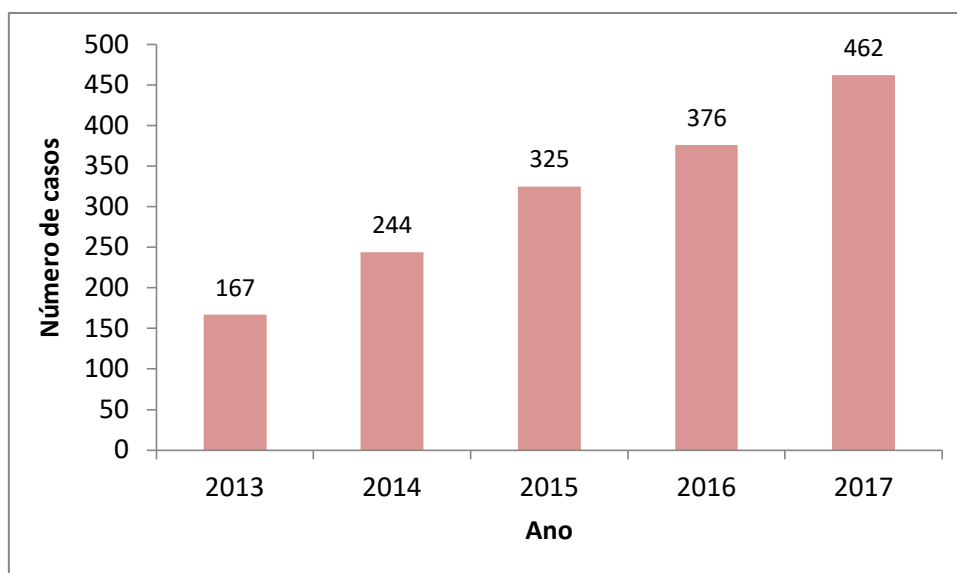


Figura 4. Número de casos confirmados de salmonelose atribuídos a *Salmonella* spp. em Portugal no período 2013-2017(FONTE: Adaptado de EFSA, 2018)

Se relativamente aos casos humanos de salmonelose em Portugal alargarmos o período de comparação para 10 anos, podemos concluir que a tendência nem sempre foi crescente, pois entre 2008-2013 houve um decréscimo significativo do número de casos.

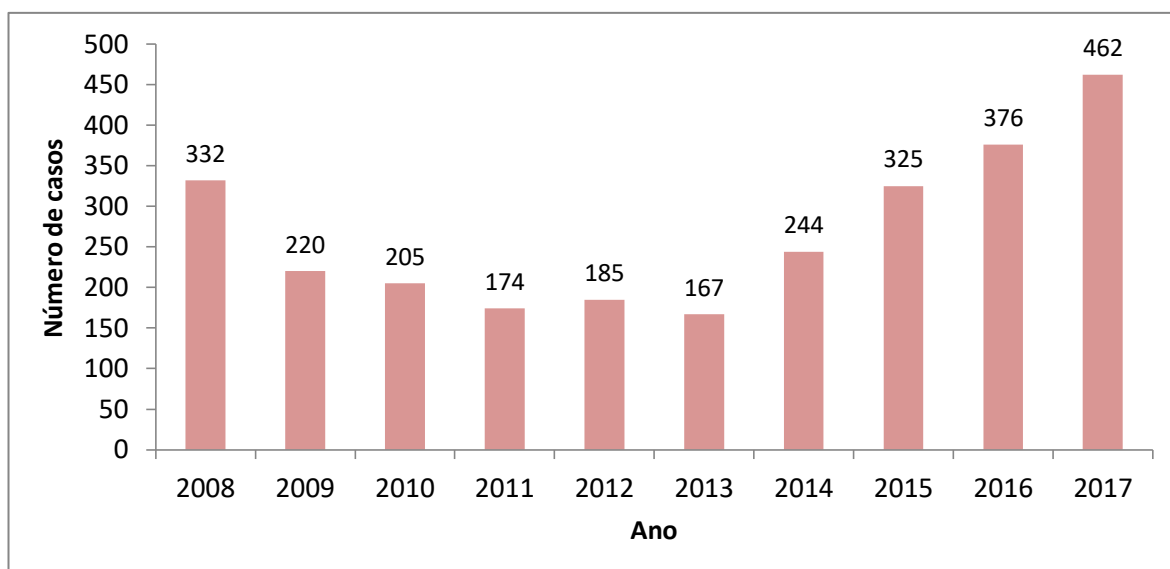


Figura 5. Número de casos confirmados de salmonelose atribuídos a *Salmonella* spp. em Portugal no período 2008-2017(FONTE: Adaptado de EFSA, 2014 e EFSA, 2018)

A presença de *Salmonella* spp. nos alimentos pode ser prevenida por meio da adoção de medidas de controlo em todas as etapas da cadeia alimentar, desde a produção agrícola, processamento, fabricação e preparação de alimentos, tanto em estabelecimentos comerciais, como nas próprias habitações. As medidas preventivas para *Salmonella* spp. são semelhantes às usadas contra outros patógenos transmitidos por alimentos.

A OMS criou um manual simples e de aplicação geral com as “Cinco Medidas Chave para uma alimentação mais segura”, as quais são:

- 1) Manter a limpeza;
- 2) Separar os alimentos crus dos alimentos cozinhados;
- 3) Cozinhar bem os alimentos;
- 4) Manter os alimentos a temperaturas seguras;
- 5) Utilizar água e matérias-primas seguras.

O cumprimento destas orientações é fulcral para prevenir doenças de origem alimentar (WHO, 2006).

4. CARACTERÍSTICAS DAS BACTÉRIAS DO GÉNERO *SALMONELLA*

O género *Salmonella* é constituído por um grupo de bactérias entéricas, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, Gram negativas em forma de pequenos bastonetes, não esporulados, capazes de crescer em diversos meios de cultura, formando colónias visíveis às 24 horas de incubação a 37 °C, fermentando a glicose com produção de gás. A fermentação da lactose não é comum para estes microrganismos, porém alguns serovares podem utilizar este açúcar. Todos os serovares são considerados patógenos para o ser humano. O género *Salmonella* compreende duas espécies que podem causar doenças nos humanos, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* mas existem mais de 2500 serovares de *Salmonella* (James *et al.*, 2005).

São bactérias amplamente distribuídas na natureza, tendo como principais hospedeiros o Homem e os animais de sangue quente. Encontram-se primariamente ao nível do trato intestinal, mas também podem ser encontradas, ocasionalmente, noutras partes do corpo. Tratando-se de uma bactéria que é excretada nas fezes dos animais podendo contaminar alimentos diversos, é facilmente disseminada ao nível internacional, originando DOA e os consequentes problemas originados por essa situação. Embora o *habitat* primário seja o trato intestinal, a verdade é que atualmente esta bactéria é ubiqüitária encontrando-se disseminada no meio ambiente, sendo que esta característica faz com que seja encontrada nos animais destinados ao consumo humano e no ambiente das indústrias que processam ou manipulam géneros alimentícios (Jay *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas *Salmonella* spp., tem estado na origem da maioria dos casos de infeções alimentares, geralmente resultantes da ingestão de ovos, aves e outras carnes, leite cru e chocolate. Os grupos mais suscetíveis a esta infeção são os denominados YOPI (*Young, Old, Pregnant and Immunocompromised*), (Cordeiro, 2014).

As bactérias do género *Salmonella* conseguem desenvolver-se e sobreviver em condições adversas, havendo estirpes capazes de crescer a temperaturas elevadas, a 48 °C, enquanto outras apresentam capacidade de se desenvolverem a 7 °C e têm uma temperatura ótima de crescimento (temperatura à qual a taxa específica de crescimento é máxima) entre 35 e 37 °C. A *Salmonella* spp. não se multiplica à

temperatura de refrigeração, contudo é extremamente resistente à congelação. Esta é destruída por pasteurização, mas teores elevados de gordura e baixa atividade da água (a_w) reduzem a eficácia dos tratamentos térmicos. Conseguem crescer em ambientes com valores de pH compreendidos entre 4,5 e 9,3 e apresentam uma taxa específica de crescimento máxima em ambientes com valores de pH entre 6,5 e 7,5. O valor do pH mínimo de crescimento (pH min) é variável, dependendo da presença, ou não, de ácidos fracos, como os ácidos acético, benzóico ou sórbico, no alimento (em presença de ácido acético, por exemplo, o valor do pH min é aproximadamente 5). Estes ácidos possuem atividade anti-microbiana podendo, inclusivamente, induzir uma perda de viabilidade (morte celular) para valores de pH inferiores a 4,0. O limite mínimo de a_w que permite o crescimento desta bactéria é de 0,93, podendo sobreviver a valores mais baixos. Por sua vez, o crescimento de *Salmonella* spp. é inibido por meios ou alimentos com uma concentração de cloreto de sódio entre 3 a 4% (FSANZ, 2018).

A contaminação cruzada ocorre quando bactérias do género *Salmonella* são transmitidas de uma fonte contaminada (um alimento contaminado, um manipulador ou animal infetado), para outros alimentos ou objetos no meio ambiente. Esta situação pode ocorrer quando carnes cruas, aves, frutos do mar, ou ovos potencialmente contaminados não são mantidos separados uns dos outros durante a preparação ou cozimento, ou quando um manipulador de alimentos não higieniza corretamente os utensílios, superfícies, equipamentos e mãos, depois de entrar em contacto com esses produtos.

A contaminação pode propagar-se para superfícies da fábrica e equipamentos, bem como superfícies e utensílios da cozinha. A contaminação cruzada também pode ocorrer pelo manuseamento de animais de estimação ou animais selvagens, ou até mesmo pelo manuseamento das suas tigelas de comida e água, seguido pelo manuseamento de alimentos, utensílios de preparação de alimentos ou outros objetos no ambiente (FSANZ, 2018).

O controlo da contaminação por este microrganismo, passa por uma vigilância desde a produção até à distribuição de géneros alimentícios, devendo ser adotadas medidas que assegurem o estado sanitário dos animais, fazendo igualmente o despiste de *Salmonella* spp. nas rações e o cumprimento das boas práticas de higiene na

produção e processamento animal, de modo a evitar quaisquer tipos de contaminação cruzada.

A salmonelose, já referida na rubrica 3.2, é assim, o termo utilizado para descrever a doença que resulta da ingestão da bactéria *Salmonella* e consequente infeção, aquando do consumo de alimentos contaminados. Este microrganismo entra no sistema digestivo, multiplica-se no intestino causando uma inflamação que resulta em gastroenterite. Os sintomas mais comuns são dores abdominais, diarreias, náuseas, vômitos, febre, podendo também ocorrer, ocasionalmente, desidratação, dor de cabeça e fadiga. O período de incubação é de 5 a 72 horas após a ingestão de alimentos contaminados e a duração da doença é de 2 a 6 dias. A situação pode tornar-se mais severa, progredindo para infeções sistémicas, podendo precipitar várias condições crónicas como artrite reativa ou síndrome de Reiter (James *et al.*, 2005).

Segundo FSANZ (2018), uma ampla variedade de alimentos tem sido implicada na salmonelose de origem alimentar, particularmente aqueles de origem animal e alimentos que foram sujeitos a contaminação fecal proveniente do meio ambiente. Exemplos de alimentos que foram atribuídos a surtos de doenças incluem: produtos de origem animal, como ovos (particularmente pratos de ovos crus), aves, carne crua, leite e lacticínios; Produtos frescos (como verduras, brotos de sementes, melões,...); Alimentos de baixa humidade, como especiarias, manteiga de amendoim e chocolate.

Os fatores que contribuem para a salmonelose incluem a contaminação cruzada durante o manuseamento de alimentos (do meio ambiente ou de produtos crus), o controlo inadequado da temperatura, o processamento inadequado e o consumo de produtos crus contaminados.

5. MICRORGANISMOS INDICADORES

Os microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes num alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a potencial deterioração do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento. Esses microrganismos indicadores podem ser utilizados para refletir a qualidade microbiológica dos alimentos em relação à vida de prateleira ou à segurança, neste último caso, devido à presença de patógenos alimentares. Em geral, microrganismos indicadores são utilizados para avaliar aspectos de qualidade e inocuidade dos alimentos (Silva, 2002). De acordo com James *et al.* (2005) alguns critérios devem ser considerados na definição de um microrganismo ou grupo de microrganismos indicadores:

- Ser fácil e rapidamente detetado;
- Ser fácil de distinguir dos outros microrganismos da microbiota dos alimentos;
- Ter uma história de constante associação com o microrganismos cuja presença indica;
- Estar sempre presente quando o microrganismos alvo está presente;
- A sua quantidade deve correlacionar-se com o número do patógeno alvo;
- Possuir exigências nutricionais e ritmos de crescimento idênticos aos do patógeno;
- Ter um ritmo de morte paralelo ao do patógeno, embora o ideal seja persistir um pouco mais (como se constata pela Figura 6).

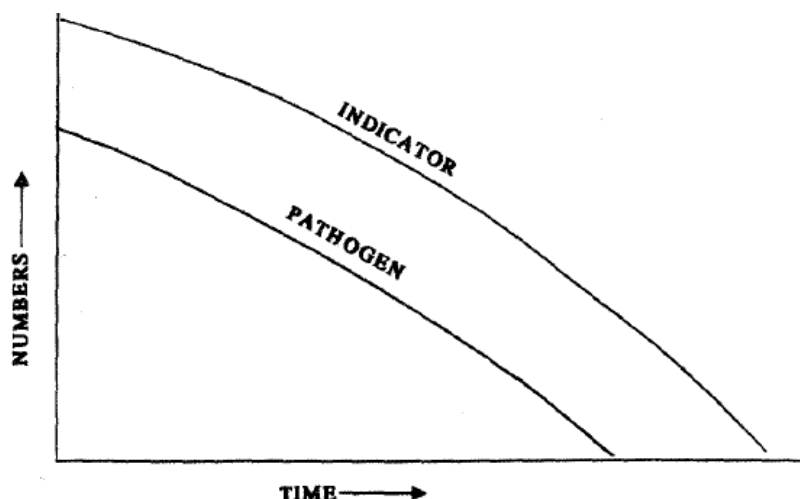


Figura 6. Relação ideal entre um microrganismo indicador e o patógeno associado (Adaptado de James et al., 2005)

Segundo Coelho *et al.* (2014), microrganismos indicadores podem ser agrupados em microrganismos que não oferecem riscos à saúde e microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde (coliformes totais, coliformes fecais, enterococos, enterobactérias totais, *Escherichia coli*).

5.1. *Enterobacteriaceae*

As *Enterobacteriaceae* são um importante indicador de contaminação microbiológica dos alimentos, correspondendo a uma família de bactérias Gram negativas, não formadoras de esporos, que incluem bastantes bactérias que podem ser encontradas no trato intestinal do ser humano ou dos animais, bem como nas plantas e no meio ambiente. Esta família inclui vários patógenos de origem alimentar, como a *Salmonella* spp., *Escherichia coli* patogénica, *Shigella* spp. e *Cronobacter* spp., bem como outras bactérias não patogénicas. Uma característica comumente usada para a deteção e enumeração das *Enterobacteriaceae* baseia-se na capacidade destas produzirem ácido e gás a partir da fermentação da glicose, além disso são Citocromo-oxidase negativas, ou seja, tem uma reação negativa ao teste da oxidase, o que permite que sejam diferenciadas de outras bactérias intimamente relacionadas.

A maioria das *Enterobacteriaceae* não fermenta a lactose, mas alguns géneros (coletivamente denominados de coliformes) são capazes de fermentar rapidamente a lactose (dentro de 24 a 48 horas) com a produção de ácido e gás. Os géneros da família das *Enterobacteriaceae* que não fermentam a lactose, ou fermentam lentamente,

incluem patógenos (por exemplo, *Salmonella*, *Shigella* e algumas *Escherichia coli* patogénicas), que não são detetados por testes de pesquisa de coliformes. A relação entre os géneros dentro das *Enterobacteriaceae* e aqueles pertencentes ao grupo dos coliformes é representada na Figura 7.

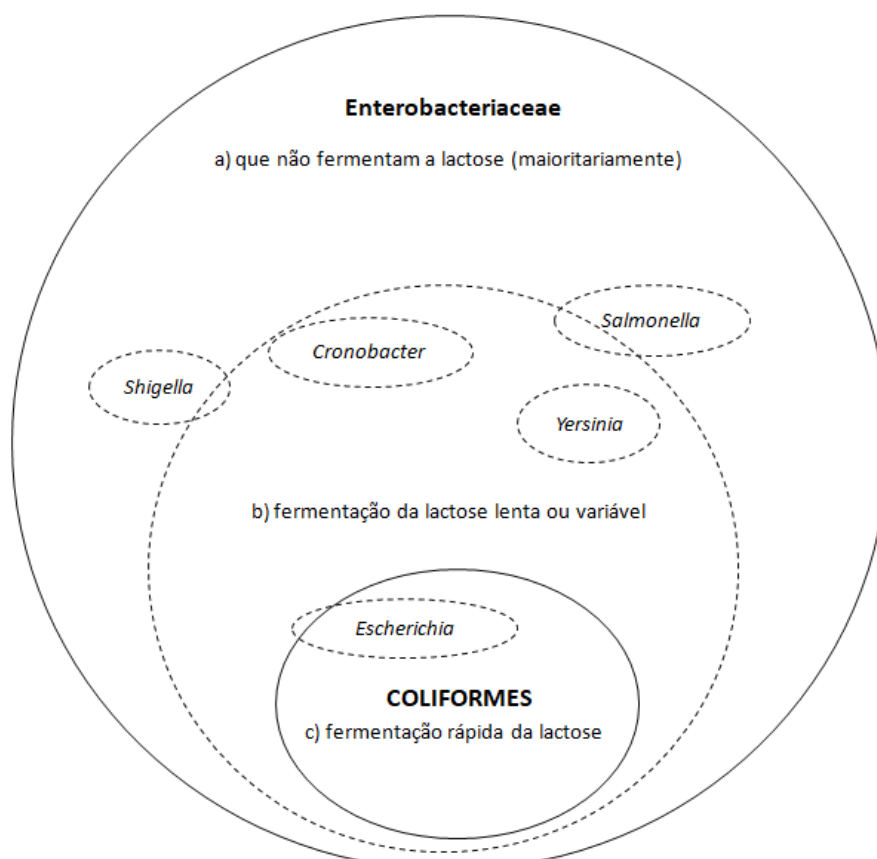


Figura 7. Relação entre os géneros dentro das *Enterobacteriaceae* e aqueles pertencentes ao grupo dos coliformes (Adaptado de FSANZ, 2018).

A contagem de *Enterobacteriaceae* é útil para avaliar a adequação das práticas de processamento e higiene, particularmente para alimentos tratados termicamente. Como as *Enterobacteriaceae* são destruídas por processos térmicos usados na produção de alimentos, a sua presença em alimentos pasteurizados ou cozidos pode indicar processamento inadequado ou contaminação pós-processo (FSANZ, 2018).

A significância dos resultados para as *Enterobacteriaceae* dependerá do tipo de alimento alvo. Por exemplo, são esperados níveis elevados dessas bactérias em alguns alimentos, como saladas e outros alimentos de origem vegetal. Existem também *Enterobacteriaceae* psicrótroficas que são capazes de se multiplicar em alimentos

refrigerados. Estes são amplamente distribuídos e encontrados numa variedade de alimentos, incluindo leite, carne e aves. Isso dificulta a interpretação dos níveis encontrados durante toda a vida útil de um alimento refrigerado, pois eles não refletem necessariamente os níveis iniciais de contaminação ou se o controlo de temperatura foi adequado. *Enterobacteriaceae* fornecem uma indicação de processamento e de boa higiene no dia da produção (FSANZ, 2018).

5.2. Aeróbios totais a 30°C

Os aeróbios totais mesófilos constituem um grupo capaz de se multiplicar entre 10 °C e 45 °C, sendo que a temperatura ideal é em torno dos 30 °C. Este grupo é importante porque inclui a maioria dos contaminantes dos alimentos de origem animal, podendo atingir elevadas quantidades quando o alimento é mantido à temperatura ambiente durante demasiado tempo (mais de 1,5 a 2 horas) (Coelho *et al.*, 2014). Segundo ICMSF (1994) o número total de microrganismos aeróbios mesófilos encontrados num alimento tem sido um dos indicadores microbiológicos da qualidade dos alimentos mais comumente utilizado, indicando se a limpeza, a desinfeção e o controlo da temperatura durante os processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados de forma adequada. Esta determinação permite também obter informação sobre a alteração inicial dos alimentos, vida útil provável, a falta de controlo no descongelamento dos alimentos ou desvios na temperatura de refrigeração estabelecida.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Técnicas de amostragem

Na recolha das amostras, foram utilizados dois métodos diferentes: o método de excisão (método destrutivo) e o método por “esfregaço” (método não destrutivo). Como o alvo de amostragem foi a superfície da carcaça, os resultados são expressos em termos de unidades formadoras de colónia (ufc) por cm².

No caso da amostragem para análise de *Enterobacteriaceae* e para a determinação do número de colónias aeróbias, onde se utilizou o método de excisão, foram recolhidas amostras de tecido de quatro pontos de cada carcaça, representando um total de 20 cm². Quando para este efeito se utiliza o método não destrutivo, a área de amostragem deve abranger pelo menos 100 cm².

Em relação à recolha de amostras para análise de *Salmonella* spp., foi utilizado o método de amostragem onde se recorreu à utilização da esponja abrasiva. Foram selecionadas as áreas mais suscetíveis de estarem contaminadas. A área total de amostragem deve cobrir, no mínimo, 400 cm².

6.1.1. Método de excisão

Neste método a amostra foi recolhida da superfície da carne (já que a parte interna da carne é normalmente estéril). Para tal recorreu-se ao uso de um molde quadrado estéril (*template*) e de um bisturi. Os moldes são feitos normalmente de metal ou plástico e são utilizados com o intuito de delimitar a área de amostragem, por exemplo, 10 cm², 50 cm² ou 100 cm². Nos locais relevantes da carcaça, foram feitas incisões circulares com um bisturi estéril (aproximadamente 2 mm de espessura) e, com uma pinça estéril, foram colocados dentro de um saco de plástico estéril devidamente rotulado. A Figura 8 foi tirada no matadouro onde se procedeu à recolha das amostras.



Figura 8. Método de excisão em carcaça

6.1.2. Método por “esfregaço”

O esfregaço é um método não destrutivo especialmente utilizado para recolher amostras de áreas maiores. A técnica inclui o uso de zaragatoas, tampões, esponjas abrasivas ou panos, dependendo principalmente das circunstâncias e da área a ser examinada. No laboratório, em que foi realizado o estágio, recorre-se à utilização da esponja abrasiva, este tipo de esponja é usado particularmente para a amostragem de áreas maiores, aumentando assim as hipóteses de detetar patógenos que estão presentes em baixos níveis nas carcaças.

Os pontos de amostragem foram selecionados tendo em conta a tecnologia de abate utilizada em cada estabelecimento. O objetivo foi examinar os locais com maior prevalência de contaminação, como demonstra a Figura 9.

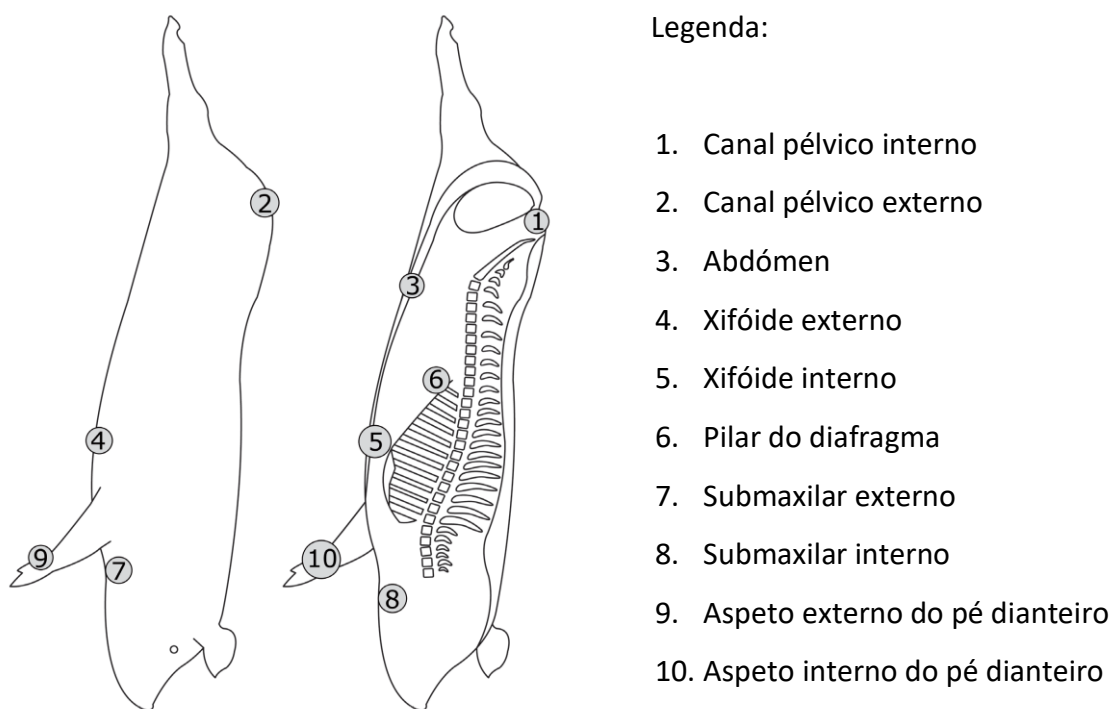


Figura 9. Exemplos de locais de amostragem

Primeiramente, escolheu-se aleatoriamente cinco carcaças, sendo que, em cada carcaça selecionaram-se quatro pontos (dos locais indicados na Figura 9). Abriu-se o saco de plástico que continha a esponja estéril e adicionou-se parte da Água Peptonada Tamponada. Depois de garantir o complemento humedecimento da esponja estéril (evitando que esta ficasse com excesso de líquido), esta foi cuidadosamente removida do saco, usando luvas desinfetadas com álcool, e, com o *template* colocado no ponto de amostragem pretendido, esfregou-se a esponja, primeiramente na horizontal e posteriormente na vertical, pelo menos 10 vezes em cada direção, alternando entre os dois lados da esponja, como demonstra a Figura 10. Por fim, a esponja foi introduzida no saco e adicionou-se a restante Água Peptonada Tamponada, de forma a perfazer um total de 25 mL.



Figura 10. Esfregação em carcaça com esponja abrasiva

6.1.3. Armazenamento e transporte das amostras

No final da recolha, as amostras foram colocadas em malas térmicas refrigeradas com termoacumuladores acondicionados em plástico bolha, pelo facto das amostras não poderem ser transportadas em contato direto com estes. A temperatura dentro do interior da mala térmica manteve-se entre 1 °C e 8 °C e o transporte efetuou-se no menor tempo possível, sendo que o tempo entre o momento da recolha e a sua análise nunca ultrapassou as 24 horas, estando armazenadas a 3 ± 2 °C.

6.2. Análises microbiológicas das amostras

6.2.1. Pesquisa de *Salmonella* spp.

6.2.1.1. Fundamento da metodologia aplicada na pesquisa de *Salmonella* spp.

O método RAPID'*Salmonella* BRD: 07/11–12/05 foi certificado pela AFNOR (*Association Française de Normalisation*) como alternativa ao método de referência NF EN ISO 6579, de acordo com a ISO 16140, para a deteção de *Salmonella* spp. em todos os produtos alimentícios para consumo humano e animal e em amostras ambientais.

Este método permite a identificação presumível de *Salmonella* spp., detetando a atividade da C8-esterase. O rastreio simultâneo da atividade da β -glucosidase permite a diferenciação de colónias de salmonelas das de outras enterobactérias.

Após a incubação em meio RAPID'*Salmonella* Agar, as colónias pertencentes ao género *Salmonella* apresentam coloração magenta (Figura 11), enquanto que as restantes apresentam cor azul ou não apresentam coloração. Este meio permite a deteção de salmonelas móveis e não móveis, assim como *Salmonella* lactose-positiva, *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi* (Bio-rad, 2015).

A cápsula RAPID'*Salmonella* é um suplemento seletivo para adicionar à Água Peptonada Tamponada, com o intuito de realizar o enriquecimento seletivo de salmonela. A sua formulação permite a multiplicação das células de salmonela, mesmo quando "stressadas", enquanto limita o crescimento da flora microbiana interferente.

A Citocromo oxidase é uma enzima pertencente ao grupo do ferro porfirina que é amplamente distribuída na natureza. Ela oxida a Citocromo c reduzida, transformando-se assim na forma reduzida e inativa. Através da transferência dos eletrões para o oxigénio molecular, a Citocromo-oxidase reduzida é novamente transformada na forma ativa. Na presença de oxigénio molecular, o sistema citocromo-oxidase/Citocromo c pode reduzir toda uma série de substâncias orgânicas, entre elas o chamado reagente NaDi (1-naftol dimetilparafenileno diamina) com formação da molécula de condensação azul de indofenol. Esta reação é usada para a classificação e identificação de bactérias.

Em relação ao teste Omni-O, este baseia-se na aglutinação, por anti-soro *Salmonella* omnivalente, de bactérias possuindo os antígenos correspondentes. O anti-soro *Salmonella* Omni-O é constituído por uma mistura de soros em bruto, obtidos por imunização de coelhos com estirpes de referência. Contém aglutininas dirigidas contra fatores antigénicos O de *Salmonellae* pertencentes aos grupos A a 60.

As Enterobactérias que fermentam a lactose possuem uma b-galactosido permease (enzima necessária para a entrada da lactose na bactéria) e uma b-galactosidase (enzima que promove a clivagem da molécula de lactose em glicose e galactose). Na ausência da b-galactosido permease, as bactérias b-galactosidase (+) não podem expressar a característica de serem lactose (+) (não ocorre acidificação do

meio contendo lactose). Neste caso, a b-galactosidase pode ser detetada utilizando um disco de O.N.P.G. Trata-se de um teste característico para a diferenciação das Enterobactérias, *Vibrioaceae* e *Pseudomonas aeruginosa* do grupo serológico O:11.

Na presença de b-galactosidase, o ortonitrofenil-B-D-galactopiranosido (O.N.P.G.), que é incolor, é clivado e liberta ortonitrofenol amarelo na solução.



Figura 11. Placa de Petri com resultado positivo para a presença de *Salmonella* spp. em meio RAPID *Salmonella* Agar (FONTE: Osborne N, 2014)

6.2.1.2. Preparação das soluções e meios de cultura para a pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., houve a necessidade de preparar em primeiro lugar os meios de cultura necessários a esta análise.

O meio de RAPID *Salmonella* Agar (Bio-Rad Laboratories, Inc.) foi preparado dissolvendo-se 43,5 g num litro de água destilada, misturando-se até se obter uma suspensão homogênea. Seguidamente, levou-se o meio de cultura ao microondas onde se deixou ferver pelo menos durante 1 minuto. Posteriormente, depois de proceder à estabilização térmica do meio em banho-maria a 47-49°C, distribuiu-se o meio de cultura em placas de Petri Ø 90mm, deixando solidificar numa superfície horizontal fria.

Para a pré-enriquecimento não seletivo de *Salmonella* spp. foi utilizada Água Peptonada Tamponada (bioMérieux® SA), 2%, esterilizada em autoclave a 121°C durante 15 min. No final do processo de esterilização, esta solução foi arrefecida antes da sua utilização, sendo que o que não foi utilizado pôde ficar armazenado para uso

futuro em local escuro a uma temperatura de $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante não mais do que 6 meses.

O meio de cultura Trypt-Casein Soy Agar (Biokar Diagnostics) foi também preparado. É um meio geral, não seletivo, utilizado para repicagem de microrganismos ou execução de taxas de recuperação. Neste caso, este meio só é utilizado para repicagem caso haja o aparecimento de colónias bacterianas de coloração magenta nas placas contendo meio RAPID'*Salmonella* Agar.

6.2.1.3. Execução da análise – Pesquisa de *Salmonella* spp.

As amostras das superfícies das carcaças recolhidas através do método não destrutivo chegam ao laboratório em malas térmicas, individualmente foram colocadas na balança, onde se adicionou 225 mL de Água Peptonada Tamponada, perfazendo um total de 250 mL. Homogeneizou-se a diluição no *stomacher* e adicionou-se a cápsula RAPID'*Salmonella* (Bio-Rad Laboratories, Inc.), homogeneizando-se novamente. Esta diluição foi a incubar a $41,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18 \pm 2\text{h}$. Passado este tempo, com uma ansa estéril colheu-se 10 μL do caldo de enriquecimento e inoculou-se numa placa contendo RAPID'*Salmonella* Agar, foi novamente a incubar a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \pm 2\text{h}$.

No final do período de incubação, quando havia placas de RAPID'*Salmonella* Agar com colónias características (coloração magenta) repicava-se 3 colónias de cada placa com uma ansa 1 μL , para outra contendo Trypt-Casein Soy Agar, este meio de cultura não seletivo ia a incubar durante $24 \pm 2\text{h}$ a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, quando terminasse as $24 \pm 2\text{h}$ realizava-se o teste de Citocromo oxidase recorrendo a tiras de oxidase (Merck KGaA), se este teste desse negativo prosseguia-se para o teste Omni-O (Bio-Rad Laboratories, Inc.), caso a aglutinação fosse positiva, prosseguia-se para o último teste onde se recorria aos discos de O.N.P.G (Bio-Rad Laboratories, Inc.), se ao fim de $24 \pm 2\text{h}$ a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ os tubos de ensaio contendo 0,5 mL de água destilada estéril e um disco de O.N.P.G permanecessem incolores considerava-se a presença de *Salmonella* spp..

Esta análise está descrita no diagrama da metodologia, ilustrado na Figura 12.

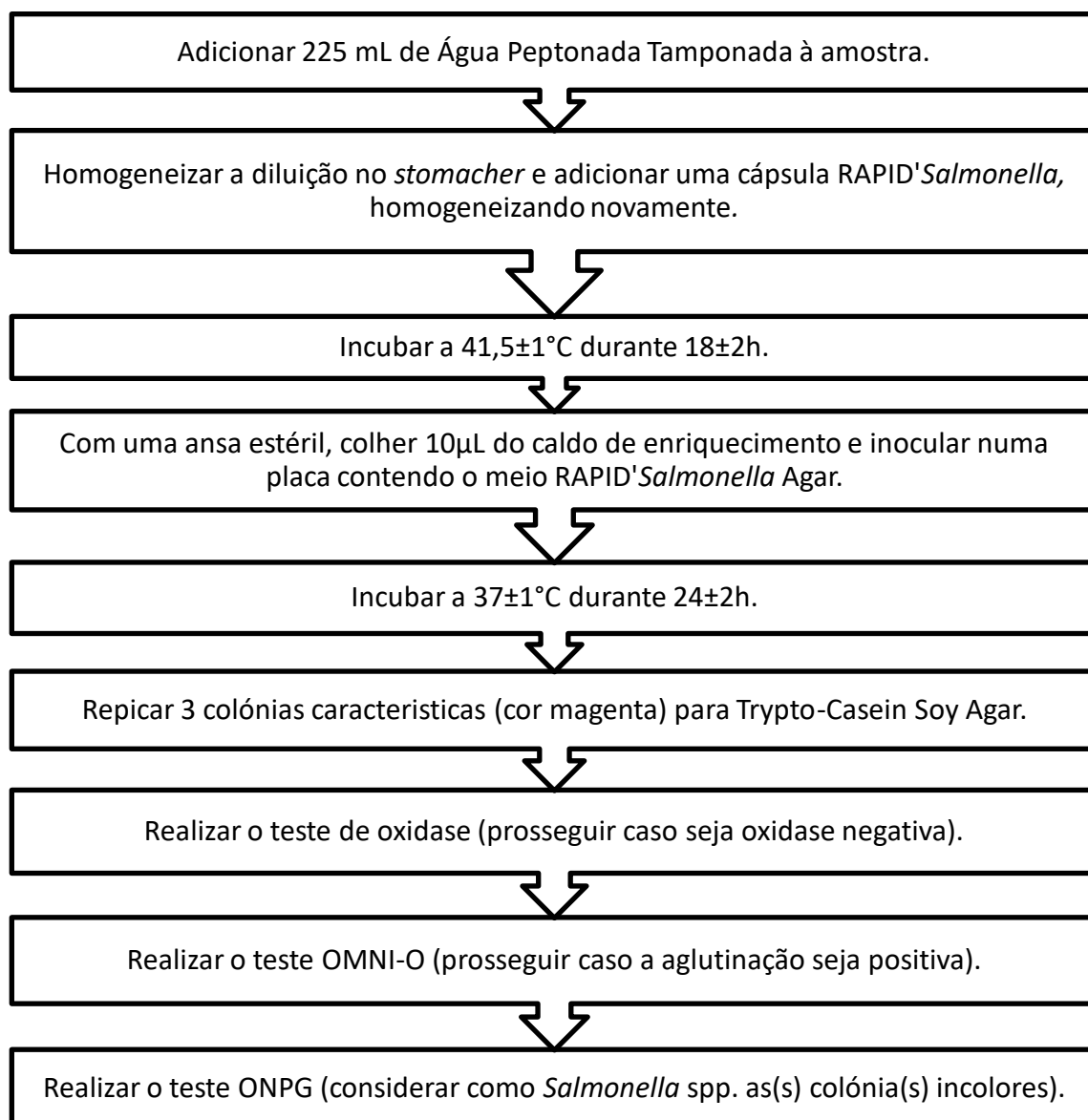


Figura 12. Diagrama resumo da metodologia para a pesquisa de *Salmonella* spp.

6.2.1.4. Expressão dos resultados de acordo com os critérios – Pesquisa de *Salmonella* spp.

De acordo com a leitura efetuada, é indicado “Presente” ou “Ausente” pela área analisada.

Os critérios de higiene dos processos relativos a carcaças de suínos para a *Salmonella* spp. estão indicados na Tabela 3.

Tabela 3. Critérios de higiene dos processos relativos a carcaças de suínos para *Salmonella* spp. (Fonte: Regulamento (CE) nº 217/2014)

Categoria de alimentos	Microrganismos	Plano de amostragem ⁽¹⁾		Limites		Método de análise de referência ⁽⁴⁾	Fase em que o critério se aplica	Medidas em caso de resultados n c m M insatisfatórios
		n	c	m	n			
Carcaças de suínos	<i>Salmonella</i>	50 ⁽²⁾	3 ⁽³⁾	Ausência na área testada em cada carcaça		EN/ISO 6579	Carcaças após a preparação mas antes da refrigeração	Melhoria da higiene no abate e reexame das modalidades de controlo dos processos e da origem dos animais, bem como das medidas de biossegurança nas explorações de origem.

⁽¹⁾ n = número de unidades que constituem a amostra; c = número de unidades da amostra com valores entre m e M

⁽²⁾ As 50 amostras serão colhidas durante 10 sessões de amostragem consecutivas, de acordo com as normas e frequências de amostragem previstas no presente regulamento.

⁽³⁾ Número de amostras em que é detetada a presença de *Salmonella*. O valor c está sujeito a reexame, a fim de ter em conta os progressos conseguidos na redução da prevalência das salmonelas. Os Estados-Membros ou regiões em que a prevalência de salmonelas seja baixa podem aplicar valores c inferiores mesmo antes desse reexame.

⁽⁴⁾ Utilizar-se-á a edição mais recente desta norma.

No caso dos testes de carcaças de suínos, o limite refere-se a amostras coletivas. Os resultados dos testes revelam a qualidade microbiológica do processo testado.

Salmonella spp. em carcaças:

- Satisfatória, se a presença de *Salmonella* spp. for detetada num máximo de c/n amostras;
- Não satisfatória, se a presença de *Salmonella* spp. for detetada em mais de c/n amostras.

Após cada sessão de amostragem avaliar-se-ão os resultados das últimas dez sessões de amostragem, a fim de obter o número n de amostras.

6.2.2. Quantificação de *Enterobacteriaceae*

6.2.2.1. Fundamento da metodologia aplicada na quantificação de *Enterobacteriaceae*

O método RAPID'*Enterobacteriaceae* BRD: 07/24 – 11/13 foi certificado pela AFNOR como alternativa ao método de referência ISO 21528-2 (12/2004), de acordo com

a ISO 16140, para a enumeração de *Enterobacteriaceae* em todos os produtos alimentícios para consumo humano e animal e em amostras ambientais.

O princípio do meio RAPID'*Enterobactereaceae* baseia-se na habilidade das *Enterobacteriaceae* fermentarem a glicose. Devido à presença simultânea de cristal de violeta e sais biliares, este meio inibe bactérias Gram positivas e algumas Gram negativas. A combinação de indicadores de cor permite um alto nível de contraste das colónias de *Enterobacteriaceae* que aparecem como vermelhas num meio cinzento claro (Figura 13).

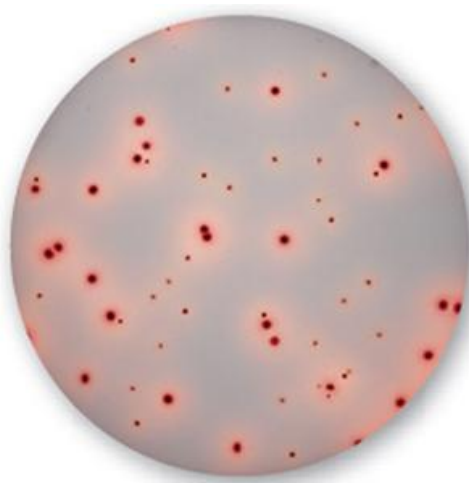


Figura 13. Placa de Petri com colónias de *Enterobacteriaceae* no meio RAPID'*Enterobactereaceae* (FONTE: Bio-Rad, s/d)

6.2.2.2. Preparação das soluções e meios de cultura para a quantificação de *Enterobacteriaceae*

O meio de cultura RAPID'*Enterobactereaceae* Agar (Bio-Rad Laboratories, Inc.) foi preparado no dia da análise, não havendo a possibilidade de preparar previamente. Para tal dissolveu-se 38 g deste meio num litro de água destilada, misturou-se bem até se obter uma suspensão homogénea e aqueceu-se gentilmente no microondas agitando frequentemente, levou-se ao ponto de ebulição e deixou-se arrefecer em banho-maria a 44-47°C, este meio não pôde permanecer no banho por mais de 4 horas.

O diluente ou meio de enriquecimento utilizado para a suspensão inicial e que permite a recuperação de quase todos os microrganismos, mesmo aqueles que se encontram sobre condições de “stress” foi a Água Peptonada Tamponada, este meio necessita ser preparado em laboratório e a sua preparação encontra-se descrita no

ponto 6.2.1.2. Tanto para a contagem de *Enterobacteriaceae* como para a contagem de aeróbios totais utilizou-se Triptona Salina (Biokar Diagnostics) para as diluições sucessivas, este foi preparado dissolvendo-se 9,5 g num litro de água destilada, levando-se a esterilizar posteriormente em autoclave a 121 °C durante 15 min, no final do processo de esterilização distribuiu-se 9 mL em tubos de ensaio, o restante diluente que não foi utilizado no dia da preparação pôde ficar armazenado para uso futuro em local escuro a uma temperatura de $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante não mais do que 3 meses.

6.2.2.3. Execução da análise - Quantificação de *Enterobacteriaceae*

As amostras das superfícies das carcaças recolhidas pelo método destrutivo chegaram ao laboratório em malas térmicas. Foram colocadas na balança, adicionou-se 100 mL de Água Peptonada Tamponada e homogeneizou-se no *stomacher*. Posteriormente transferiu-se 1 mL da solução mãe e de uma série de diluições decimais sucessivas para placas de Petri Ø90 mm, às quais se adicionou cerca de 15 mL de RAPID'*Enterobacteriaceae* a 44-47°C e misturou-se cuidadosamente com o inóculo, deixou-se solidificar numa superfície horizontal fria e adicionou-se uma segunda camada (incorporação em dupla camada - *overlay*) de aproximadamente 5 mL de meio. Depois de solidificado o meio, as placas invertidas foram incubadas a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \pm 2\text{h}$.

Esta análise está descrita no diagrama da metodologia, na Figura 14.

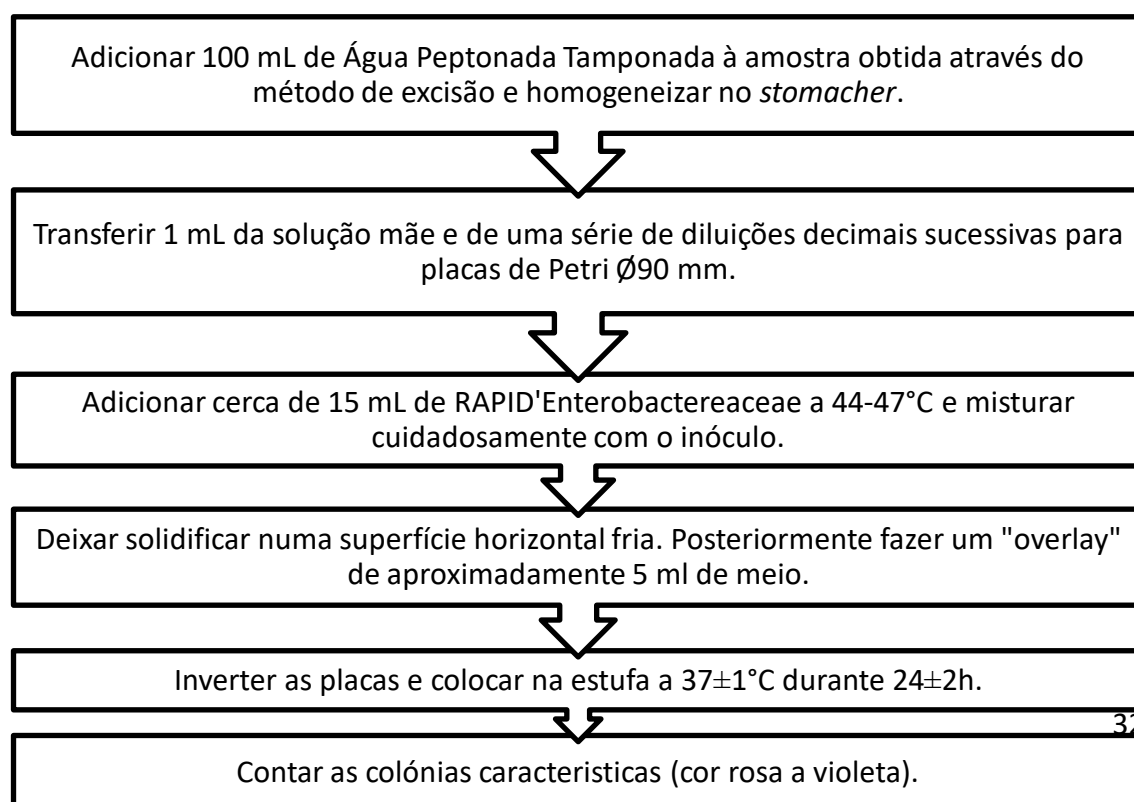


Figura 14. Diagrama resumo da metodologia para a quantificação de *Enterobacteriaceae*

6.2.2.4. Expressão dos resultados de acordo com os critérios – Quantificação de *Enterobacteriaceae*

Após o período de incubação referido anteriormente, procedeu-se à contagem das colónias nas placas que continham menos de 300 colónias. As colónias que se encontravam espalhadas foram consideradas como colónias únicas. Quando menos de um quarto da placa se encontrava coberta por colónias espalhadas, contava-se as colónias que se encontravam fora dessa área e calculava-se o número correspondente à placa inteira. Por sua vez, caso as colónias espalhadas ocupassem mais de um quarto da placa, descartava-se a contagem.

Os métodos de cálculo utilizados seguem a ISO 7218:2007. Para que um resultado seja válido, geralmente é considerado necessário contar as colónias em pelo menos uma placa contém pelo menos 10 colónias (colónias totais, colónias típicas ou colónias que atendam aos critérios de identificação). O número N de microrganismos presentes na amostra de teste é calculado como uma média ponderada de duas diluições sucessivas, usando a Equação (1):

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

$\sum C$ é a soma das colónias contadas nas duas placas referentes às duas diluições sucessivas, em que pelo menos uma das quais contém um mínimo de 10 colónias;

V é o volume do inoculo colocado em cada placa, em mililitros;

d é a diluição correspondente à primeira diluição considerada (maior que 10 e menor que 300 colónias).

O resultado resultante da Equação (1) é arredondado para dois algarismos significativos, de preferência expressado como um número entre 1,0 e 9,9 multiplicado pela potência apropriada de 10, ou um número inteiro com dois algarismos significativos e como o número N de microrganismos por mililitro (produtos líquidos) ou por grama (outros produtos).

No caso das carcaças de suínos, o resultado é expresso por ufc/cm², para tal multiplica-se N pelo volume total de Água Peptonada Tamponada adicionada à

amostra (100 mL) e divide-se esse valor por 20 cm² (área de amostragem utilizada no laboratório onde decorreu o estágio).

Os critérios de higiene dos processos relativos a carcaças de suínos para as *Enterobacteriaceae* estão indicados na Tabela 4.

Tabela 4. Critérios de higiene dos processos relativos a carcaças de suínos para *Enterobacteriaceae* (Fonte: Regulamento (CE) nº 1831/2003)

Categoria de alimentos	Microrganismos	Limites		Método de análise de referência (2)	Fase em que o critério se aplica	Medidas em caso de resultados m M insatisfatórios
		m	n			
Carcaças de suínos (1)	<i>Enterobacteriaceae</i>	2,0 log ufc/cm ² média logarítmica diária	3,0 log ufc/cm ² média logarítmica diária	ISO 21528-2	Carcaças após a preparação mas antes da refrigeração	Melhoria da higiene no abate e reexame das modalidades de controlo dos processos

(1) Os limites (m e M) só se aplicarão a amostras colhidas pelo método destrutivo. A média logarítmica diária será calculada determinando em primeiro lugar o valor logarítmico do resultado de cada teste e calculando em seguida a média destes valores.

(2) Utilizar-se-á a edição mais recente da norma.

Os valores de m e M indicados aplicam-se apenas a amostras colhidas pelo método destrutivo e referem-se à média logarítmica diária, esta média é calculada determinando primeiro o logaritmo do resultado de cada teste e em seguida a média destes valores. No caso dos testes de carcaças, o limite refere-se a amostras coletivas. Os resultados dos testes revelam a qualidade microbiológica do processo testado.

Enterobacteriaceae em carcaças de suínos:

- Satisfatória, se a média logarítmica diária for $\leq m$;
- Aceitável, se a média logarítmica diária estiver entre m e M;
- Não satisfatória, se a média logarítmica diária for $> M$.

6.2.3. Contagem de aeróbios totais a 30°C

6.2.3.1. Fundamento da metodologia aplicada na contagem de aeróbios totais a 30°C

Plate Count Agar (PCA) é um meio sugerido por APHA (American Public Health Association), AOAC (Association of official analytical chemists), ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), ISO (International

Organization for Standardization) para enumeração de microrganismos aeróbios e heterotróficos anaeróbios facultativos em água, efluentes, alimentos e gêneros alimentícios. Este meio é recomendado pela norma ISO 4833 para a enumeração da contagem bacteriana total a 30°C.

Em relação aos constituintes deste meio, a triptona é um produto obtido através de uma hidrólise enzimática controlada da caseína e contém uma mistura de peptídeos e aminoácidos livres necessários para apoiar o crescimento bacteriano. O extrato de levedura é uma fonte de aminoácidos e vitaminas do grupo B, a glicose é a fonte de energia e o agar o agente solidificante.

Para a contagem de aeróbios totais a 30°C foi seguida a metodologia descrita na ISO 4833-1:2013.

6.2.3.2. Preparação das soluções e meios de cultura para a contagem de aeróbios totais a 30°C

Dissolveram-se 20,5 g de PCA (Biokar Diagnostics) num litro de água destilada, misturando-se cuidadosamente. Deixou-se repousar durante alguns minutos e, seguidamente esterilizou-se em autoclave a 121 °C durante 15 min. No final do processo de esterilização, este meio de cultura teve que arrefecer em banho-maria a 44-47°C antes da sua utilização, sendo que o restante pôde ficar armazenado para uso futuro em local escuro a uma temperatura de $5 \pm 3^\circ\text{C}$ durante não mais do que 6 meses.

6.2.3.3. Execução da análise - Quantificação de aeróbios totais a 30°C

As amostras das superfícies das carcaças recolhidas através do método destrutivo chegaram ao laboratório em malas térmicas. Individualmente foram colocadas na balança, onde se adicionou 100 mL de Água Peptonada Tamponada. Após, homogeneização no *stomacher*, transferiu-se 1 mL da solução mãe e de uma série de diluições decimais sucessivas para placas de Petri Ø90 mm, às quais se adicionou cerca de 15 mL de PCA a 44-47°C e misturou-se cuidadosamente com o inóculo. Deixou-se solidificar numa superfície horizontal fria. Depois de solidificado o meio, as placas invertidas foram colocadas a incubar a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante $72 \pm 3\text{h}$.

Esta análise está descrita no diagrama da metodologia, na Figura 15.

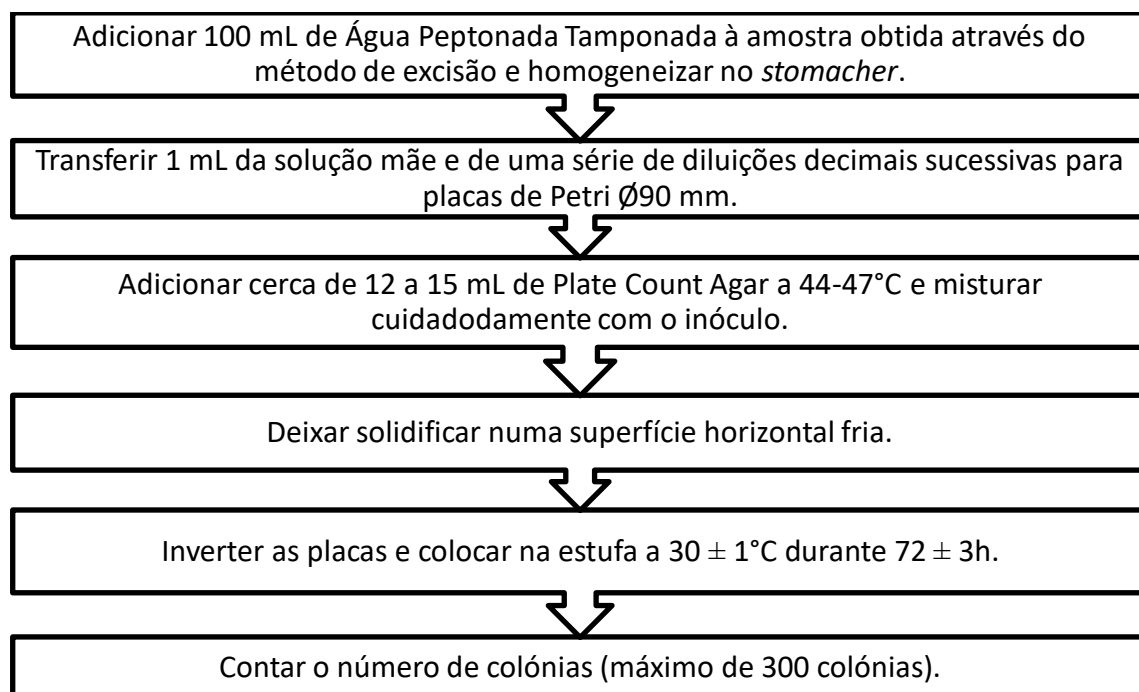


Figura 15. Diagrama resumo da metodologia para a contagem de aeróbios totais a 30°C

6.2.3.4. Expressão dos resultados de acordo com os critérios – Quantificação de aeróbios totais a 30°C

Aplica-se a mesma metodologia que a descrita no ponto 6.2.2.4..

Os critérios de higiene dos processos relativos a carcaças de suínos para o número de aeróbios totais estão patentes na Tabela 5, sendo o parâmetro referido no Regulamento (CE) nº 1441/2007, como número de colónias aeróbias.

Tabela 5. Critérios de higiene dos processos relativos a carcaças de suínos para o número de aeróbios totais a 30°C (Fonte: Regulamento (CE) nº 1441/2007)

Categoria de alimentos	Microrganismos	Limites		Método de análise de referência ⁽²⁾	Fase em que o critério se aplica	Medidas em caso de resultados m M insatisfatórios
		m	n			
Carcaças de suínos ⁽¹⁾	Número de colónias aeróbias	4,0 log ufc/cm ² média logarítmica diária	5,0 log ufc/cm ² média logarítmica diária	ISO 4833	Carcaças após a preparação mas antes da refrigeração	Melhoria da higiene no abate e reexame das modalidades de controlo dos processos

⁽¹⁾ Os limites (m e M) só se aplicarão a amostras colhidas pelo método destrutivo. A média logarítmica diária será calculada determinando em primeiro lugar o valor logarítmico do resultado de cada teste e calculando em seguida a média destes valores.

⁽²⁾ Utilizar-se-á a edição mais recente da norma.

No caso dos testes de carcaças, o limite refere-se a amostras coletivas. Os resultados dos testes revelam a qualidade microbiológica do processo testado.

Número total de colónias aeróbias nas carcaças:

- Satisfatória, se a média logarítmica diária for $\leq m$;
- Aceitável, se a média logarítmica diária estiver entre m e M ;
- Não satisfatória, se a média logarítmica diária for $> M$.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Apresentação e discussão dos resultados

As contagens dos microrganismos indicadores e todos os resultados de pesquisa de *Salmonella* spp. obtidos em cada uma das 525 amostras analisadas, encontram-se nas tabelas em Anexo.

Como se pretendeu com este trabalho, investigar se existe uma relação estatística entre a presença de *Salmonella* spp. e a quantidade de microrganismos indicadores de higiene (*Enterobacteriaceae* e aeróbios totais a 30°C), o tratamento estatístico dos dados foi realizado com recurso ao programa *Microsoft Office Excel 2017*.

Em relação à presença de *Salmonella* spp. foi possível observar uma expressiva diferença entre o número de amostras positivas e negativas (Figura 16), ou seja, em 525 amostras totais, apenas foi detetada esta bactéria em 42 (8%).

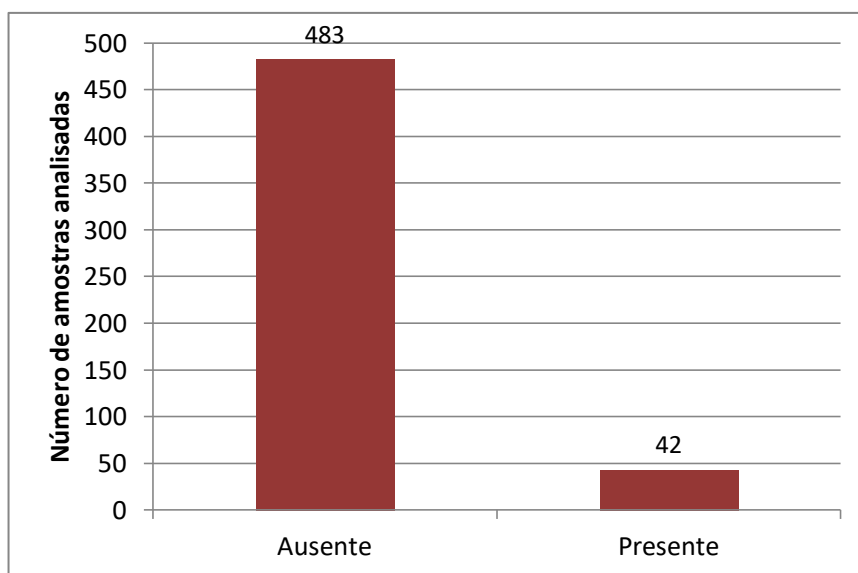


Figura 16. Relação entre o número de amostras analisadas e a pesquisa de *Salmonella* spp.

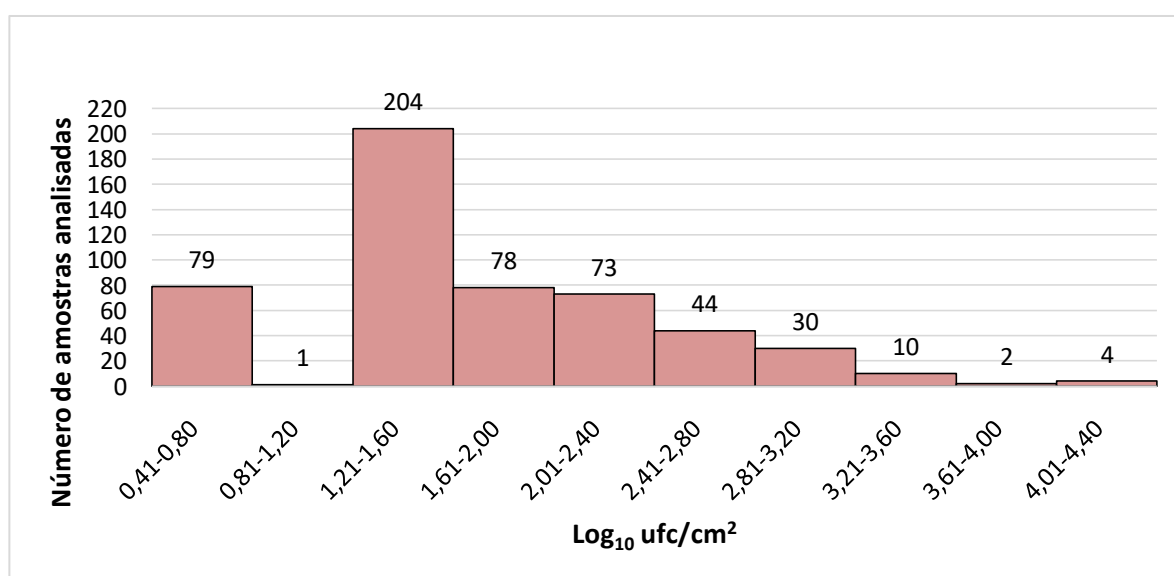
A Tabela 6 contém os resultados da quantificação dos indicadores de higiene. As contagens de *Enterobacteriaceae* variaram entre 0,70 Log₁₀ ufc/cm² e 4,32 Log₁₀ ufc/cm², enquanto as de aeróbios totais a 30°C, oscilaram entre 0,90 Log₁₀ ufc/cm² e 5,88 Log₁₀ ufc/cm², sendo que a média total de *Enterobacteriaceae* foi de 1,72 ± 0,72 Log₁₀ ufc/cm² e de aeróbios totais a 30°C, 3,33 ± 0,66 Log₁₀ ufc/cm².

Tabela 6. Resumo dos resultados de quantificação dos Indicadores de Higiene nas amostras analisadas (n=525)

	<i>Enterobacteriaceae</i> (Log ₁₀ ufc/cm ²)	Aeróbios totais a 30°C (Log ₁₀ ufc/cm ²)
Média e Desvio-padrão	1,72 ± 0,72	3,33 ± 0,66
Mediana	1,54	3,36
Mínimo	0,70	0,90
Máximo	4,32	5,88

Os gráficos da Figura 17 e da Figura 18, apresentam a frequência dos resultados globais de todas as amostras para *Enterobacteriaceae* e aeróbios totais a 30°C.

Pelo histograma de frequências. para a quantificação de *Enterobacteriaceae*, representado na Figura 17 verificamos que as 525 amostras analisadas se encontram distribuídas por valores de contagens, de diversas ordens de grandeza, com maior incidência no intervalo de 1,21 a 1,60 Log₁₀ ufc/cm². Em contrapartida, a Figura 18 demonstra que, no que toca à concentração de aeróbios totais a 30°C, existe uma maior tendência para as amostras analisadas apresentarem valores da ordem 10², 10³ e 10⁴ Log₁₀ ufc/cm².


Figura 17. Frequência dos resultados globais de todas as amostras para *Enterobacteriaceae*

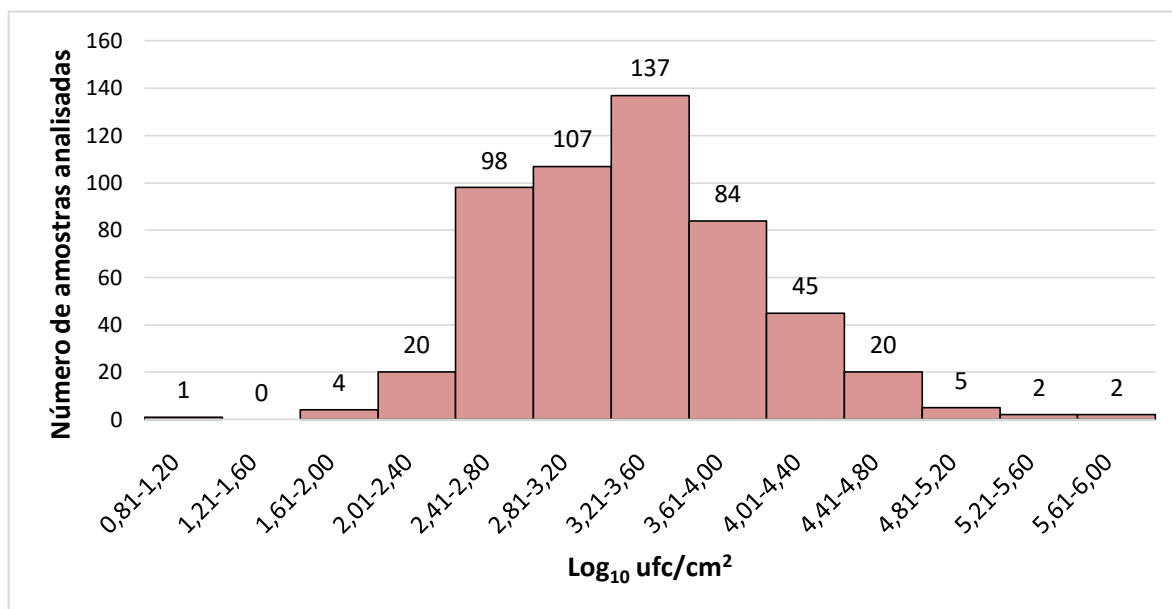


Figura 18. Frequência dos resultados globais de todas as amostras para aeróbios totais a 30°C

7.1.1. Relação entre a quantidade de *Enterobacteriaceae* e a pesquisa de *Salmonella* spp.

Através da observação da Figura 19, constata-se que o número de amostras com contagens de *Enterobacteriaceae* inferiores a 3,20 Log₁₀ ufc/cm², em que há presença de *Salmonella* spp. é muito baixo (representando menos de 10%), o que nos permite inferir que é elevada a probabilidade de não haver presença de bactérias deste género, quando a concentração de *Enterobacteriaceae* é baixa. Proporcionalmente, a percentagem de amostras com presença de *Salmonella* spp. aumenta para valores superiores a 10%, quando estas apresentam concentrações superiores a 3,21 Log₁₀ ufc/cm² de *Enterobacteriaceae*. Contudo apenas 16 amostras se encontram nesta situação, não sendo possível retirar com rigor qualquer conclusão.

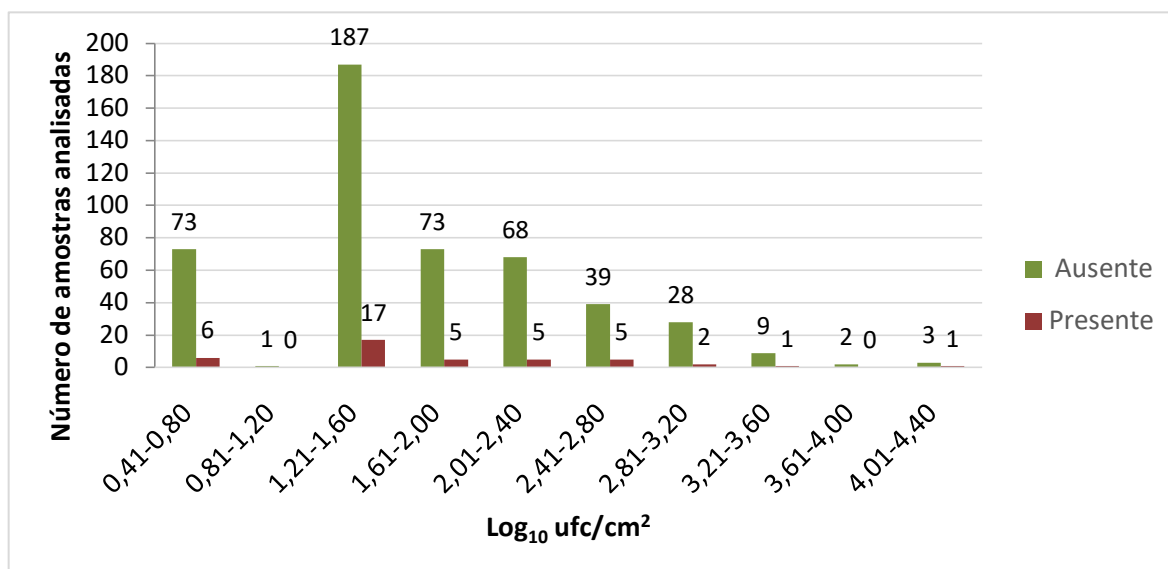


Figura 19. Frequência dos resultados para a pesquisa de *Salmonella* spp. em função da contagem de *Enterobacteriaceae*

De forma a responder à pergunta “Será que a quantidade de *Enterobacteriaceae* é dependente da presença de *Salmonella* spp.?”, elaborou-se um diagrama de caixa, presente na Figura 20. Este é um gráfico em que é possível representar a relação entre uma variável quantitativa (quantidade de *Enterobacteriaceae*) e uma variável qualitativa (presença/ausência de *Salmonella* spp.), o eixo vertical representa os valores da variável quantitativa, e o eixo horizontal representa as categorias da variável qualitativa (Marcondes, s/d).

No diagrama da Figura 20, importa salientar que a mediana, tanto para a presença como para a ausência de *Salmonella* spp. é muito parecida, assim como o primeiro e o terceiro quartil. Relacionando com os dados patentes na Tabela 7, podemos admitir que não existe relação entre estas duas variáveis, já que:

- Os diagramas de caixa tanto para a ausência como para a presença de *Salmonella* spp. são muito parecidos (mediana, primeiro e terceiro quartil);
- A média da contagem de *Enterobacteriaceae* para a presença e para a ausência de *Salmonella* spp. é similar (Tabela 7).
- O desvio-padrão da contagem de *Enterobacteriaceae*, para a pesquisa desta bactéria patogénica é superior ao desvio-padrão da contagem de *Enterobacteriaceae* em geral.

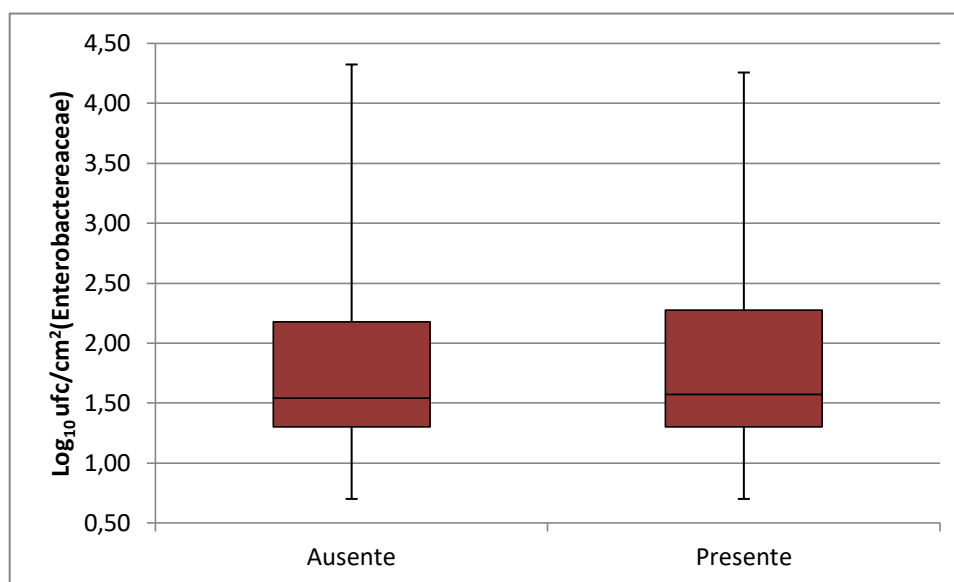


Figura 20. Diagrama de caixa para a pesquisa de *Salmonella* spp em função da contagem de *Enterobacteriaceae*

Tabela 7. Média e Desvio-padrão da contagem de *Enterobacteriaceae* para a pesquisa de *Salmonella* spp.

	Média (Log ₁₀ ufc/cm ²)	Desvio-padrão (Log ₁₀ ufc/cm ²)	Mínimo (Log ₁₀ ufc/cm ²)	Máximo (Log ₁₀ ufc/cm ²)
Ausente	1,71	0,72	0,70	4,32
Presente	1,76	0,79	0,70	4,26
Total geral	1,74	0,76	0,70	4,29

7.1.2. Relação entre a quantidade de aeróbios totais a 30°C e a pesquisa de *Salmonella* spp.

Para estudar a dependência destas duas variáveis, aeróbios totais a 30°C e *Salmonella* spp., elaborou-se um gráfico de barras e um diagrama de caixa, tal como explicado anteriormente.

Pela observação da Figura 21, notamos que no intervalo de contagens de 2,41 a 4,40 Log₁₀ ufc/cm², quando em comparação com concentrações fora deste intervalo, existe um maior número de amostras com presença de *Salmonella* spp. No entanto este número é muito baixo, em proporção ao total de amostras que se enquadram dentro deste intervalo de valores. Posto isto, e perante estes resultados, podemos deduzir que não existe relação entre a concentração deste indicador microbiano e o patógeno em estudo.

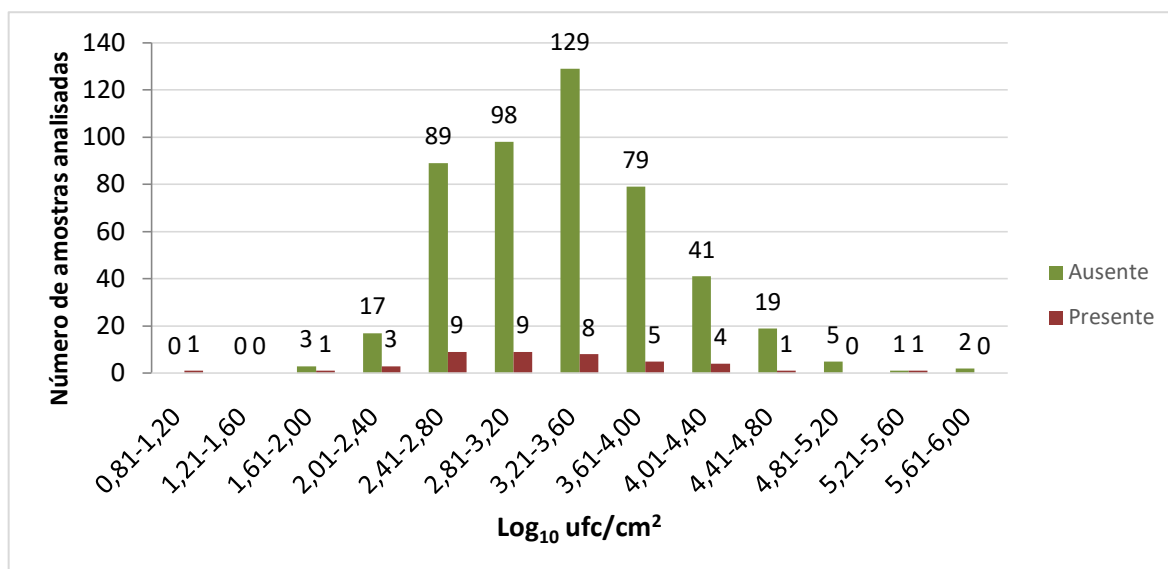


Figura 21. Frequência dos resultados para a pesquisa de *Salmonella* spp em função da contagem de aeróbios totais a 30°C

No seguimento desta análise e de forma a responder à pergunta “Será que a presença *Salmonella* spp. depende da quantidade de aeróbios totais a 30°C?”, foi elaborado um diagrama de caixa, de maneira a ajudar na visualização da quantidade de aeróbios totais para cada uma das hipóteses (Ausente ou Presente). Assim como na análise anterior, a mediana, o primeiro e o terceiro quartil para os dois retângulos são similares.

Posto isto, e em conjunto com os dados da Tabela 8, onde verificamos que o desvio-padrão da contagem de aeróbios totais a 30°C, para a pesquisa de *Salmonella* spp. é maior que o desvio-padrão da contagem de aeróbios totais a 30°C em geral, podemos concluir que não existe relação entre estas duas variáveis.

Podemos ainda utilizar este diagrama para observar a variação dos dados, que é dada pelo tamanho do retângulo. Quanto maior a altura da caixa, maior a distância entre o primeiro e o terceiro quartil, o que implica uma maior dispersão dos dados (Martinez, 2015). Assim, para esta situação, os dados encontram-se mais dispersos quando a *Salmonella* spp. se encontra presente.

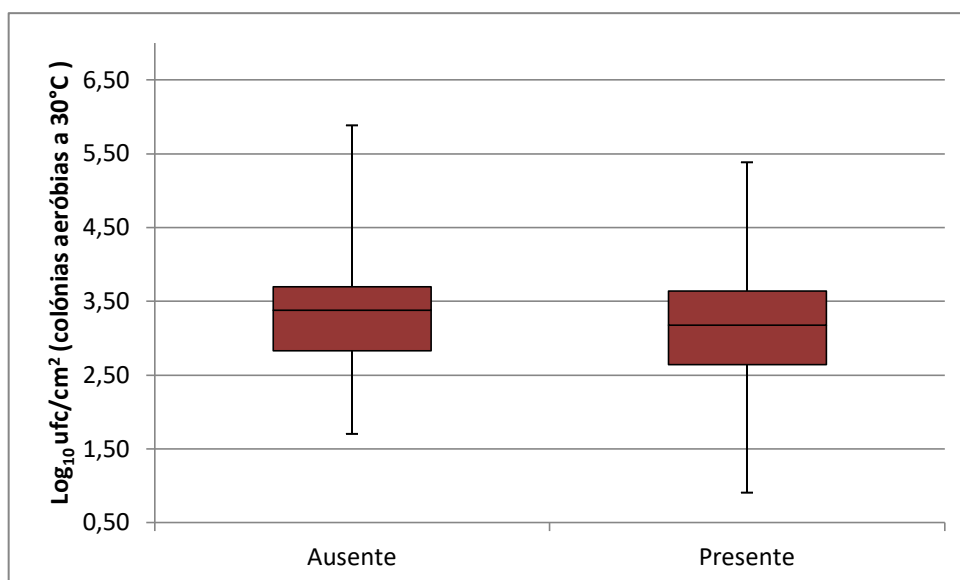


Figura 22. Diagrama de caixa para a pesquisa de *Salmonella* spp em função da contagem de aeróbios totais a 30°C

Tabela 8. Média e Desvio-padrão da contagem de aeróbios totais a 30°C para a pesquisa de *Salmonella* spp.

	Média (Log ₁₀ ufc/cm ²)	Desvio-padrão (Log ₁₀ ufc/cm ²)	Mínimo (Log ₁₀ ufc/cm ²)	Máximo (Log ₁₀ ufc/cm ²)
Ausente	3,34	0,64	1,70	5,88
Presente	3,18	0,82	0,90	5,38
Total geral	3,26	0,73	1,30	5,63

Os resultados desta análise demonstraram que a quantidade dos indicadores de higiene estudados não seriam indicadores particularmente confiáveis das concentrações de *Salmonella* spp., o que vai de encontro a um parecer emitido em 2007 pelo Painel Científico dos Riscos Biológicos (Painel BIOHAZ) da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA), em que estes afirmaram não ser possível estabelecer uma correlação entre as *Enterobacteriaceae* e a *Salmonella* spp. Posteriormente surgiu um estudo efetuado por Ghafir *et al.* (2008) e Delhalle *et al.* (2008), em que estes contrariaram o anterior e afirmaram existir uma correlação significativa entre os números de *Enterobacteriaceae* e a presença de *Salmonella* spp., relatando que as contagens de *Enterobacteriaceae* em carcaças de suínos eram significativamente maiores nas amostras contaminadas com *Salmonella* spp.

Saliente-se o facto de que nas amostras estudadas no presente estudo as concentrações de aeróbios totais e de *Enterobacteriaceae* não terem apresentado valores muito elevados, mantendo-se os valores médios abaixo dos limites legislados. Apenas 24 amostras (4,6% do total) apresentaram valores acima dos limites indicados para as *Enterobacteriaceae* e apenas 5 (0,9%), os limites indicados para os aeróbios totais a 30°C. Uma hipótese a testar será averiguar uma maior evidência desta correlação, num maior número de amostras que apresentem valores mais elevados. Isto porque, valores mais elevados traduzem naturalmente amostras mais contaminadas, eventualmente um maior número de células de *Salmonella* spp. e, por conseguinte, uma mais fácil deteção laboratorial desta bactéria.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A possibilidade de existir uma forte correlação entre as concentrações dos grupos microbianos indicadores e a presença de microrganismos patogénicos numa amostra, poderá permitir que a vigilância dos indicadores de higiene possa constituir um substituto fiável e mais económico, das análises de pesquisa desses mesmos patógenos.

Neste contexto, procurou-se com o presente estudo estabelecer uma correlação estatística entre a presença de *Salmonella* spp. e a quantidade de indicadores de higiene (*Enterobacteriaceae* e aeróbios totais a 30°C), em carcaças de suínos.

Tendo em conta os resultados obtidos nas condições do trabalho, não foi possível estabelecer esta correlação entre a quantidade *Enterobacteriaceae* e a presença de *Salmonella* spp., pois a presença desta bactéria foi detetada num intervalo muito alargado de valores de *Enterobacteriaceae* ($0,70 \log_{10}$ ufc/cm² a $4,26 \log_{10}$ ufc/cm²) e o mesmo se constatou em relação aos aeróbios totais a 30°C.

No que respeita à avaliação microbiológica das carcaças de suínos provenientes deste matadouro, verificou-se que os valores médios das contagens de *Enterobacteriaceae* e aeróbios totais a 30°C ($1,72 \log_{10}$ ufc/cm² e $3,33 \log_{10}$ ufc/cm², respetivamente), encontram-se dentro dos limites estabelecidos no Regulamento (CE) nº 1441/2007 ($3,0 \log_{10}$ ufc/cm² para as *Enterobacteriaceae* e $5,0 \log_{10}$ ufc/cm² para os aeróbios totais).

Importa sublinhar que a determinação da correlação entre as concentrações de um indicador e o organismo patogénico é complexa, porque os conjuntos de dados dos testes microbianos geralmente contêm uma grande proporção de falhas, devido por exemplo a amostras em que a concentração real não é observável, ou em que os patógenos, embora presentes, não são detetados, ou a amostras que apenas se revelam positivas nos testes de triagem.

Uma forma de alcançar o objetivo geral traçado, poderá passar por procurar o mesmo tipo de correlação, em relação a outros microrganismos patogénicos, que constituam perigo para os consumidores de carnes. Poder-se-ia alargar a amostragem, e/ou fazer a avaliação numa mesma carcaça, em diferentes fases do processo de abate

e refrigeração, isto tendo em conta que as interações entre microrganismos e os fatores abióticos podem influenciar os valores num determinado momento ou de certa forma encobrir a presença dos microrganismos patogénicos.

9. BIBLIOGRAFIA

Alves A (2012). *Doenças alimentares de origem bacteriana*. (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Porto

Biasino W, Zutter L, Mattheus W, Bertrand S, Uyttendaele M, Damme I (2017). Correlation between slaughter practices and the distribution of *Salmonella* and hygiene indicator bacteria on pig carcasses during slaughter. *Elsevier*

Bio-Rad (2015). RAPID'Salmonella. Consultado em Julho 25, 2018 em: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/fsd/literature/TS_RSalmoneella.pdf

Bio-Rad (s/d). RAPID'Enterobacteriaceae Medium. Consultado em Agosto 8, 2019 em: <http://www.bio-rad.com/en-pl/product/rapidEnterobacteriaceae-medium?ID=MS7LZA15>

Carreira L (2011). *Patologias mais relevantes nos suínos criados em sistemas de produção intensiva no concelho de Leiria*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa.

Castelo D (2008). *Harmonização de procedimentos de amostragem em carcaças*. Consultado em Agosto 20, 2019 em: <http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-04/n4-sequali-09.pdf>

Coelho T, Lima H, Ferreira H (2014). *Microrganismos indicadores em alimentos de origem animal*.

Cordeiro M (2014). *Avaliação da correlação entre a presença de E.coli, coliformes fecais e totais e Salmonella spp. nos alimentos*. Instituto Superior de Ciências Da Saúde Egas Moniz.

Cunha I, Santos I (2007). *Patogénicos Emergentes em Alimentos*. Consultado em Agosto 9, 2019 em: <http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-02/SEQUALI-02.pdf>

Delhalle L, De Sadeleer L, Bollaerts K, Farnir F, Saegerman C, Korsak N, Dewulf J, De Zutter L, Daube G (2008). *Risk factors for Salmonella and hygiene indicators in the 10 largest belgian pig slaughterhouses*. J. Food Prot.

EFSA-European Food Safety Authority (2012). Scientific opinion on an estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in turkeys. *EFSA Journal*.

EFSA-European Food Safety Authority (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*

EFSA-European Food Safety Authority (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*

FSANZ-Food Standards Australia New Zealand (2018). *Compendium of Microbiological Criteria for Food*

Ghafir Y, China B, Dierick K, De Zutter L, Daube G (2008). *Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium*. J. Food Prot.

ICMSF-International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1994). *Microrganismos de los alimentos. 1. Técnicas de análisis microbiológico*. Zaragoza

ILAC-International Laboratory Accreditation Cooperation (2010). *Vantagens de ser um laboratório acreditado*

INSA (2018). *Investigação laboratorial de surtos de toxinfecção alimentar*. Consultado em Agosto 9, 2019 em: [http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/5551/1/Boletim Epidemiologico Observacoes N21 2018 artigo6.pdf](http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/5551/1/Boletim%20Epidemiologico%20Observacoes%20N21%202018%20artigo6.pdf)

INSA (2019). *Investigação laboratorial de surtos de toxinfecção alimentar: dados referentes a 2017*. Consultado em Agosto 20, 2019 em: <http://www.insa.min-saude.pt/investigacao-laboratorial-de-surtos-de-toxinfecao-alimentar-dados-referentes-a-2017/>

IPAC-Instituto Português de Acreditação (s/d). *A Acreditação*. Consultado em Setembro 4, 2017 em: <http://www.ipac.pt/ipac/funcao.asp>

IPAC-Instituto Português de Acreditação (2017). *Regulamento Geral de Acreditação*

ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 7218:2007 - Amendment 1.

ISO 4833-1:2013 – Microbiology of food and animal feeding stuff – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30°C

ISO 17604:2015 - Microbiology of the food chain — Carcass sampling for microbiological analysis.

James J, Loessner M, Golden D (2005). *Modern Food Microbiology*, New York, EUA. Springer

Lima E, Pinto P, Santos J, Vanetti M, Bevilacqua P, Almeida L, Pinto M, Dias F (2004). *Isolamento de Salmonella sp e Staphylococcus aureus no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC*

Marcondes D (s/d). *Análise descritiva através de um boxplot*. Consultado em Setembro 4, 2019 em: <http://assessoriaestatistica.com.br/blog/boxplot>

Martinez E (2015). *Bioestatística para os cursos de graduação da área da saúde*. Blucher

Osborne N (2014). *A colorful future for culture media*. Consultado em Maio 5, 2019 em: <https://www.thermofisher.com/blog/food/a-colorful-future-for-culture-media/>

Portal QAS (s/d). *A acreditação de laboratórios – ISO/IEC 17025*. Consultado em Julho 30, 2019 em: <https://www.portalgas.pt/acreditacao-de-laboratorios-np-en-isoiec-17025.html>

Regulamento (CE) nº 1441/2007. Comissão de 5 de Dezembro de 2007 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios

Regulamento (CE) nº 217/2014. Comissão de 7 de Março de 2014 relativo a *Salmonella* em carcaças de suínos.

Thorberg M, Engvall A (2001). *Incidence of Salmonella in five Swedish slaughter houses.*

Scallan E, Hoekstra M, Angulo J, Tauxe V, Widdowson A, Roy L, Jones L, Griffin M (2011). *Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens.*

Silva M (2002). *Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate.* São Paulo

Soares E (2007). *Doenças de origem alimentar. Infecções e Intoxicações.*

WHO-World Health Organization (2006). *Cinco Chaves para uma Alimentação mais Segura.* Consultado em Agosto 21, 2019 em:

https://www.who.int/foodsafety/consumer/5KeysManual_pt.pdf

Williams M & Ebel E (2014). Estimating the correlation between concentrations of two species of bacteria with censored microbial testing data. *International Journal of Food Microbiology*

10. ANEXOS

Tabela 9. Amostras de carcaças de suínos provenientes de um matadouro no distrito de Coimbra.

Amostra	Data de colheita	Log (Enterobacteriaceae)	Log (Microrganismos a 30°C)	Salmonella (/400cm ²)
3468/17	20/06/2017	1,30	2,68	Ausente
3469/17	20/06/2017	1,30	3,62	Ausente
3471/17	20/06/2017	1,40	3,43	Ausente
3467/17	20/06/2017	1,60	3,30	Ausente
3470/17	20/06/2017	2,40	3,74	Ausente
3664/17	28/06/2017	0,70	2,62	Ausente
3668/17	28/06/2017	0,70	3,48	Ausente
3665/17	28/06/2017	1,48	3,43	Ausente
3667/17	28/06/2017	1,54	3,43	Ausente
3666/17	28/06/2017	2,30	2,63	Ausente
3777/17	05/07/2017	0,70	2,95	Ausente
3778/17	05/07/2017	1,30	2,74	Ausente
3786/17	05/07/2017	1,30	3,65	Ausente
3785/17	05/07/2017	1,30	4,18	Ausente
3788/17	05/07/2017	1,48	4,26	Ausente
3789/17	05/07/2017	1,60	3,77	Ausente
3787/17	05/07/2017	1,96	4,04	Ausente
3775/17	05/07/2017	2,18	3,30	Ausente
3776/17	05/07/2017	3,00	4,18	Ausente
3779/17	05/07/2017	3,18	4,70	Ausente
4038/17	18/07/2017	1,40	3,41	Ausente
4039/17	18/07/2017	1,40	4,57	Ausente
4036/17	18/07/2017	2,08	4,45	Ausente
4035/17	18/07/2017	2,15	4,20	Ausente
4037/17	18/07/2017	2,51	4,74	Ausente
4116/17	20/07/2017	0,70	2,86	Ausente
4115/17	20/07/2017	1,30	2,58	Ausente
4118/17	20/07/2017	1,30	3,08	Ausente
4117/17	20/07/2017	1,60	2,98	Ausente
4119/17	20/07/2017	2,20	3,76	Ausente
4459/17	02/08/2017	0,70	2,59	Ausente
4457/17	02/08/2017	0,70	2,65	Ausente
4458/17	02/08/2017	0,70	3,08	Presente
4460/17	02/08/2017	0,70	3,08	Ausente
4456/17	02/08/2017	2,34	3,54	Ausente
4440/17	02/08/2017	3,08	4,86	Ausente
4438/17	02/08/2017	3,32	4,91	Ausente
4436/17	02/08/2017	3,52	5,56	Ausente
4437/17	02/08/2017	4,15	5,88	Ausente
4439/17	02/08/2017	4,32	5,80	Ausente
4708/17	17/08/2017	0,70	3,00	Ausente
4703/17	17/08/2017	1,30	2,78	Ausente
4704/17	17/08/2017	1,30	2,96	Ausente
4702/17	17/08/2017	1,40	3,60	Ausente
4706/17	17/08/2017	1,48	2,83	Ausente
4699/17	17/08/2017	1,54	3,40	Ausente
4701/17	17/08/2017	1,70	4,00	Ausente

4700/17	17/08/2017	1,80	3,80	Ausente
4705/17	17/08/2017	1,89	3,34	Ausente
4707/17	17/08/2017	3,00	3,28	Ausente
4976/17	30/08/2017	0,70	2,46	Ausente
4974/17	30/08/2017	1,30	2,57	Ausente
4977/17	30/08/2017	2,15	3,04	Ausente
4978/17	30/08/2017	2,28	3,36	Ausente
4975/17	30/08/2017	2,78	3,54	Ausente
5248/17	12/09/2017	1,30	2,54	Ausente
5249/17	12/09/2017	2,23	4,08	Ausente
5250/17	12/09/2017	2,45	3,82	Ausente
5251/17	12/09/2017	2,62	3,66	Ausente
5252/17	12/09/2017	3,11	4,11	Ausente
5328/17	14/09/2017	0,70	2,61	Ausente
5324/17	14/09/2017	1,60	3,41	Ausente
5325/17	14/09/2017	1,70	3,49	Ausente
5326/17	14/09/2017	2,18	3,43	Ausente
5327/17	14/09/2017	2,40	3,36	Ausente
5697/17	27/09/2017	0,70	2,91	Ausente
5695/17	27/09/2017	1,30	2,61	Ausente
5698/17	27/09/2017	1,30	2,62	Ausente
5688/17	27/09/2017	1,30	2,89	Ausente
5696/17	27/09/2017	1,30	3,20	Ausente
5689/17	27/09/2017	1,30	3,49	Ausente
5686/17	27/09/2017	1,48	3,40	Ausente
5687/17	27/09/2017	1,96	2,52	Ausente
5699/17	27/09/2017	2,20	3,79	Ausente
5685/17	27/09/2017	2,26	3,11	Ausente
5904/17	10/10/2017	1,30	3,57	Ausente
5905/17	10/10/2017	1,40	3,91	Ausente
5907/17	10/10/2017	1,48	3,11	Ausente
5906/17	10/10/2017	1,54	3,67	Ausente
5903/17	10/10/2017	1,65	2,41	Ausente
5983/17	12/10/2017	0,70	2,45	Presente
5984/17	12/10/2017	0,70	3,45	Presente
5982/17	12/10/2017	1,30	2,81	Ausente
5981/17	12/10/2017	1,30	3,04	Ausente
5985/17	12/10/2017	1,93	3,51	Ausente
6274/17	25/10/2017	0,70	3,36	Ausente
6273/17	25/10/2017	1,30	2,30	Ausente
6272/17	25/10/2017	1,30	2,74	Ausente
6293/17	25/10/2017	1,70	3,61	Ausente
6295/17	25/10/2017	1,81	3,30	Ausente
6292/17	25/10/2017	1,93	2,91	Ausente
6291/17	25/10/2017	1,98	3,36	Ausente
6294/17	25/10/2017	2,08	3,40	Ausente
6275/17	25/10/2017	2,28	3,95	Ausente
6271/17	25/10/2017	3,38	3,92	Ausente
6541/17	07/11/2017	2,08	3,08	Ausente
6539/17	07/11/2017	2,34	3,54	Ausente

6538/17	07/11/2017	2,38	3,52	Ausente
6540/17	07/11/2017	2,40	3,61	Ausente
6537/17	07/11/2017	2,56	3,86	Ausente
6610/17	09/11/2017	0,70	2,60	Ausente
6612/17	09/11/2017	1,30	2,67	Ausente
6613/17	09/11/2017	1,30	3,30	Ausente
6611/17	09/11/2017	2,23	4,40	Ausente
6614/17	09/11/2017	2,72	3,58	Ausente
6891/17	22/11/2017	1,30	3,23	Ausente
6888/17	22/11/2017	1,30	3,49	Ausente
6890/17	22/11/2017	1,40	2,48	Ausente
6886/17	22/11/2017	1,89	3,38	Ausente
6885/17	22/11/2017	1,89	3,71	Ausente
6889/17	22/11/2017	1,91	2,65	Ausente
6887/17	22/11/2017	2,00	3,51	Ausente
6884/17	22/11/2017	2,08	3,61	Ausente
6892/17	22/11/2017	2,86	4,00	Ausente
6883/17	22/11/2017	3,57	4,52	Ausente
7273/17	05/12/2017	1,30	3,51	Ausente
7274/17	05/12/2017	1,74	3,43	Presente
7276/17	05/12/2017	1,74	4,26	Presente
7275/17	05/12/2017	1,74	4,26	Ausente
7272/17	05/12/2017	2,04	3,30	Presente
7322/17	06/12/2017	1,30	3,32	Presente
7317/17	06/12/2017	1,54	3,15	Presente
7323/17	06/12/2017	1,60	2,96	Ausente
7320/17	06/12/2017	2,04	3,68	Presente
7321/17	06/12/2017	2,74	3,66	Ausente
7694/17	20/12/2017	0,70	2,56	Ausente
7695/17	20/12/2017	0,70	3,40	Ausente
7693/17	20/12/2017	1,30	2,51	Ausente
7692/17	20/12/2017	1,30	2,60	Ausente
7691/17	20/12/2017	1,30	2,72	Ausente
7701/17	20/12/2017	1,93	3,32	Ausente
7703/17	20/12/2017	2,04	3,48	Ausente
7705/17	20/12/2017	2,11	4,30	Ausente
7704/17	20/12/2017	2,32	4,46	Ausente
7702/17	20/12/2017	2,46	2,45	Ausente
0014/18	03/01/2018	1,30	2,23	Presente
0015/18	03/01/2018	1,30	2,30	Presente
0016/18	03/01/2018	1,40	2,94	Presente
0024/18	03/01/2018	1,70	2,78	Ausente
0025/18	03/01/2018	1,83	2,81	Ausente
0026/18	03/01/2018	1,86	3,68	Ausente
0023/18	03/01/2018	2,04	3,08	Ausente
0027/18	03/01/2018	2,04	3,56	Ausente
0013/18	03/01/2018	2,30	3,20	Presente
0017/18	03/01/2018	2,41	3,41	Presente
0260/18	17/01/2018	0,70	2,54	Ausente
0262/18	17/01/2018	0,70	2,74	Ausente

0259/18	17/01/2018	0,70	2,90	Ausente
0261/18	17/01/2018	0,70	3,08	Ausente
0263/18	17/01/2018	1,30	3,49	Ausente
0251/18	17/01/2018	1,40	3,53	Ausente
0253/18	17/01/2018	1,65	3,78	Presente
0249/18	17/01/2018	1,74	3,81	Ausente
0250/18	17/01/2018	1,78	3,81	Ausente
0252/18	17/01/2018	2,41	3,83	Ausente
0494/18	30/01/2018	1,30	3,40	Ausente
0495/18	30/01/2018	1,30	3,40	Ausente
0498/18	30/01/2018	1,30	3,96	Ausente
0496/18	30/01/2018	1,48	3,48	Ausente
0497/18	30/01/2018	2,56	3,41	Ausente
0553/18	01/02/2018	0,70	2,30	Ausente
0554/18	01/02/2018	0,70	2,56	Ausente
0557/18	01/02/2018	0,70	3,11	Ausente
0558/18	01/02/2018	1,30	2,96	Ausente
0556/18	01/02/2018	1,30	3,51	Ausente
0846/18	14/02/2018	0,70	2,51	Ausente
0844/18	14/02/2018	0,70	2,53	Ausente
0830/18	14/02/2018	0,70	2,54	Ausente
0843/18	14/02/2018	1,30	2,38	Ausente
0845/18	14/02/2018	1,30	2,65	Ausente
0828/18	14/02/2018	1,30	2,67	Ausente
0831/18	14/02/2018	1,40	2,54	Ausente
0832/18	14/02/2018	1,40	3,36	Ausente
0829/18	14/02/2018	1,40	3,51	Ausente
0847/18	14/02/2018	2,59	2,76	Ausente
1218/18	01/03/2018	0,70	3,11	Ausente
1229/18	01/03/2018	1,04	2,85	Ausente
1227/18	01/03/2018	1,30	2,70	Ausente
1228/18	01/03/2018	1,30	2,77	Ausente
1217/18	01/03/2018	1,30	2,98	Ausente
1215/18	01/03/2018	1,30	3,08	Ausente
1216/18	01/03/2018	1,30	3,56	Ausente
1219/18	01/03/2018	1,30	3,63	Ausente
1226/18	01/03/2018	1,54	3,67	Ausente
1225/18	01/03/2018	1,83	3,54	Ausente
1406/18	14/03/2018	0,70	3,08	Ausente
1404/18	14/03/2018	1,30	2,97	Ausente
1403/18	14/03/2018	1,30	3,43	Ausente
1402/18	14/03/2018	1,30	3,89	Ausente
1400/18	14/03/2018	2,00	3,43	Ausente
1401/18	14/03/2018	2,18	3,70	Ausente
1399/18	14/03/2018	2,28	3,60	Ausente
1405/18	14/03/2018	2,30	3,72	Ausente
1398/18	14/03/2018	2,49	3,52	Ausente
1397/18	14/03/2018	2,74	3,65	Ausente
1842/18	28/03/2018	1,30	2,92	Ausente
1844/18	28/03/2018	1,40	3,00	Ausente

1841/18	28/03/2018	1,40	3,54	Ausente
1843/18	28/03/2018	1,48	3,08	Ausente
1845/18	28/03/2018	2,63	3,38	Ausente
1854/18	28/03/2018	2,74	4,20	Ausente
1851/18	28/03/2018	3,36	4,46	Ausente
1853/18	28/03/2018	3,43	4,93	Ausente
1852/18	28/03/2018	3,51	5,04	Ausente
1855/18	28/03/2018	4,18	5,00	Ausente
2092/18	11/04/2018	0,70	2,41	Ausente
2086/18	11/04/2018	1,30	2,45	Presente
2089/18	11/04/2018	1,30	2,57	Ausente
2084/18	11/04/2018	1,30	3,30	Presente
2088/18	11/04/2018	1,30	3,32	Ausente
2083/18	11/04/2018	1,30	3,48	Ausente
2085/18	11/04/2018	1,30	3,52	Ausente
2091/18	11/04/2018	1,40	3,81	Ausente
2087/18	11/04/2018	1,54	2,72	Ausente
2090/18	11/04/2018	1,54	3,46	Ausente
2416/18	24/04/2018	0,70	3,00	Ausente
2408/18	24/04/2018	1,60	4,15	Ausente
2414/18	24/04/2018	1,70	3,85	Ausente
2406/18	24/04/2018	1,74	3,66	Ausente
2417/18	24/04/2018	1,95	2,70	Ausente
2404/18	24/04/2018	1,95	4,48	Ausente
2405/18	24/04/2018	1,98	4,18	Ausente
2418/18	24/04/2018	2,20	3,11	Ausente
2407/18	24/04/2018	2,36	4,08	Ausente
2415/18	24/04/2018	3,00	4,15	Ausente
2715/18	09/05/2018	0,70	2,56	Ausente
2717/18	09/05/2018	1,30	2,76	Ausente
2714/18	09/05/2018	1,81	3,04	Ausente
2727/18	09/05/2018	1,86	3,54	Ausente
2713/18	09/05/2018	1,96	3,41	Ausente
2726/18	09/05/2018	2,11	4,45	Ausente
2723/18	09/05/2018	2,20	4,30	Ausente
2716/18	09/05/2018	2,41	4,20	Ausente
2724/18	09/05/2018	2,48	4,00	Ausente
2725/18	09/05/2018	2,95	3,54	Ausente
3096/18	24/05/2018	0,70	2,76	Ausente
3087/18	24/05/2018	0,70	2,76	Ausente
3086/18	24/05/2018	1,30	2,83	Ausente
3085/18	24/05/2018	1,30	3,20	Ausente
3088/18	24/05/2018	1,30	3,32	Presente
3097/18	24/05/2018	1,30	3,38	Ausente
3094/18	24/05/2018	1,30	3,70	Ausente
3098/18	24/05/2018	1,30	4,08	Ausente
3095/18	24/05/2018	1,40	3,98	Ausente
3084/18	24/05/2018	1,85	3,41	Ausente
3362/18	06/06/2018	0,70	2,43	Ausente
3365/18	06/06/2018	0,70	2,70	Ausente

3356/18	06/06/2018	0,70	3,28	Ausente
3361/18	06/06/2018	0,70	3,36	Ausente
3364/18	06/06/2018	1,48	2,68	Ausente
3360/18	06/06/2018	1,81	3,48	Ausente
3357/18	06/06/2018	1,90	3,57	Ausente
3359/18	06/06/2018	1,93	3,85	Ausente
3358/18	06/06/2018	2,04	3,49	Ausente
3363/18	06/06/2018	2,58	3,93	Presente
3748/18	21/06/2018	0,70	3,00	Ausente
3752/18	21/06/2018	1,30	2,57	Ausente
3750/18	21/06/2018	1,30	3,38	Ausente
3749/18	21/06/2018	1,48	2,60	Ausente
3747/18	21/06/2018	1,74	3,23	Ausente
3745/18	21/06/2018	1,98	3,72	Ausente
3743/18	21/06/2018	2,00	3,53	Ausente
3744/18	21/06/2018	2,11	4,34	Ausente
3746/18	21/06/2018	2,18	2,51	Ausente
3751/18	21/06/2018	2,32	2,74	Ausente
4087/18	04/07/2018	0,70	2,46	Ausente
4086/18	04/07/2018	0,70	2,75	Ausente
4084/18	04/07/2018	0,70	2,81	Ausente
4083/18	04/07/2018	0,70	3,60	Ausente
4085/18	04/07/2018	1,30	2,49	Ausente
4194/18	05/07/2018	1,30	3,91	Ausente
4193/18	05/07/2018	1,48	3,26	Ausente
4197/18	05/07/2018	1,54	3,45	Ausente
4195/18	05/07/2018	1,78	2,81	Ausente
4196/18	05/07/2018	2,28	3,73	Ausente
4431/18	16/07/2018	0,70	3,08	Ausente
4430/18	16/07/2018	0,70	3,34	Ausente
4432/18	16/07/2018	0,70	3,49	Ausente
4434/18	16/07/2018	1,30	3,15	Ausente
4433/18	16/07/2018	1,30	3,20	Ausente
4495/18	18/07/2018	0,70	2,82	Ausente
4494/18	18/07/2018	0,70	3,26	Ausente
4492/18	18/07/2018	1,60	2,79	Ausente
4496/18	18/07/2018	2,30	3,34	Ausente
4493/18	18/07/2018	2,34	2,28	Ausente
4889/18	31/07/2018	0,70	2,78	Ausente
4886/18	31/07/2018	0,70	3,56	Ausente
4888/18	31/07/2018	1,30	3,04	Ausente
4887/18	31/07/2018	1,30	3,49	Ausente
4885/18	31/07/2018	1,93	3,69	Ausente
4952/18	02/08/2018	1,30	2,85	Presente
4951/18	02/08/2018	1,30	3,23	Ausente
4954/18	02/08/2018	2,41	4,48	Ausente
4953/18	02/08/2018	3,30	4,32	Presente
4950/18	02/08/2018	4,26	5,38	Presente
5237/18	16/08/2018	1,30	3,15	Ausente
5248/18	16/08/2018	1,30	3,52	Ausente

5238/18	16/08/2018	1,30	3,70	Ausente
5236/18	16/08/2018	1,30	3,73	Ausente
5249/18	16/08/2018	1,40	2,66	Ausente
5247/18	16/08/2018	1,77	2,74	Ausente
5235/18	16/08/2018	1,83	3,98	Presente
5246/18	16/08/2018	1,86	3,04	Ausente
5239/18	16/08/2018	2,18	4,34	Ausente
5245/18	16/08/2018	2,18	4,34	Ausente
5440/18	27/08/2018	0,70	3,51	Ausente
5439/18	27/08/2018	1,30	2,79	Ausente
5443/18	27/08/2018	1,30	3,59	Ausente
5442/18	27/08/2018	1,30	3,86	Ausente
5441/18	27/08/2018	1,40	3,99	Ausente
5479/18	29/08/2018	0,70	4,34	Ausente
5478/18	29/08/2018	1,30	2,53	Ausente
5476/18	29/08/2018	1,48	2,54	Ausente
5480/18	29/08/2018	2,54	3,00	Ausente
5477/18	29/08/2018	2,93	3,45	Ausente
5698/18	10/09/2018	1,30	3,41	Ausente
5699/18	10/09/2018	1,30	4,04	Ausente
5701/18	10/09/2018	1,48	3,38	Ausente
5700/18	10/09/2018	1,91	4,56	Ausente
5702/18	10/09/2018	2,32	3,28	Ausente
5763/18	12/09/2018	0,70	2,73	Ausente
5766/18	12/09/2018	0,70	2,82	Ausente
5764/18	12/09/2018	0,70	2,91	Ausente
5765/18	12/09/2018	1,30	2,66	Ausente
5762/18	12/09/2018	1,60	3,70	Ausente
6151/18	26/09/2018	0,70	2,74	Ausente
6153/18	26/09/2018	0,70	2,74	Ausente
6155/18	26/09/2018	1,30	2,18	Ausente
6154/18	26/09/2018	1,30	2,56	Ausente
6152/18	26/09/2018	1,30	2,70	Ausente
6165/18	26/09/2018	2,20	3,23	Ausente
6163/18	26/09/2018	2,61	3,81	Ausente
6161/18	26/09/2018	2,86	4,18	Ausente
6162/18	26/09/2018	2,89	3,45	Ausente
6164/18	26/09/2018	3,04	3,38	Ausente
6389/18	08/10/2018	1,30	2,83	Ausente
6390/18	08/10/2018	1,30	2,86	Ausente
6386/18	08/10/2018	1,30	3,51	Ausente
6387/18	08/10/2018	1,30	3,93	Ausente
6388/18	08/10/2018	1,65	3,79	Ausente
6484/18	10/10/2018	1,30	2,53	Ausente
6485/18	10/10/2018	1,30	3,48	Ausente
6487/18	10/10/2018	1,85	2,23	Ausente
6488/18	10/10/2018	1,88	2,94	Ausente
6486/18	10/10/2018	2,28	3,00	Ausente
6882/18	24/10/2018	0,70	2,52	Ausente
6880/18	24/10/2018	0,70	2,58	Ausente

6878/18	24/10/2018	1,30	4,38	Ausente
6892/18	24/10/2018	1,65	3,23	Ausente
6881/18	24/10/2018	2,00	3,57	Ausente
6879/18	24/10/2018	2,04	3,54	Ausente
6890/18	24/10/2018	2,30	3,72	Ausente
6891/18	24/10/2018	2,45	3,63	Ausente
6888/18	24/10/2018	2,54	3,99	Ausente
6889/18	24/10/2018	2,58	3,48	Ausente
7235/18	08/11/2018	1,30	3,20	Ausente
7234/18	08/11/2018	1,30	3,49	Ausente
7224/18	08/11/2018	1,30	3,76	Ausente
7237/18	08/11/2018	1,60	3,65	Ausente
7238/18	08/11/2018	1,60	3,95	Ausente
7228/18	08/11/2018	1,65	3,15	Ausente
7236/18	08/11/2018	1,65	3,70	Ausente
7225/18	08/11/2018	1,93	3,56	Ausente
7227/18	08/11/2018	2,15	4,34	Ausente
7226/18	08/11/2018	2,20	3,75	Ausente
7552/18	21/11/2018	0,70	2,72	Ausente
7548/18	21/11/2018	0,70	2,81	Ausente
7551/18	21/11/2018	1,30	3,04	Ausente
7550/18	21/11/2018	1,30	3,18	Ausente
7549/18	21/11/2018	1,54	2,40	Ausente
7562/18	21/11/2018	1,54	3,32	Ausente
7561/18	21/11/2018	1,65	3,34	Ausente
7559/18	21/11/2018	1,83	3,45	Ausente
7558/18	21/11/2018	2,00	4,08	Ausente
7560/18	21/11/2018	2,15	3,41	Ausente
7825/18	03/12/2018	0,70	3,32	Ausente
7823/18	03/12/2018	1,30	2,82	Ausente
7821/18	03/12/2018	1,30	2,83	Ausente
7824/18	03/12/2018	1,40	2,70	Ausente
7822/18	03/12/2018	2,38	3,38	Ausente
7880/18	05/12/2018	0,70	2,86	Ausente
7881/18	05/12/2018	1,30	2,54	Ausente
7878/18	05/12/2018	1,48	3,56	Ausente
7877/18	05/12/2018	1,60	3,43	Ausente
7879/18	05/12/2018	1,98	3,81	Ausente
8296/18	19/12/2018	2,28	4,63	Ausente
8300/18	19/12/2018	2,32	3,48	Ausente
8298/18	19/12/2018	2,36	2,70	Ausente
8297/18	19/12/2018	2,62	3,61	Ausente
8299/18	19/12/2018	2,68	4,34	Ausente
8278/18	19/12/2018	2,83	4,18	Ausente
8279/18	19/12/2018	2,98	4,30	Ausente
8277/18	19/12/2018	3,00	4,30	Ausente
8276/18	19/12/2018	3,04	4,45	Ausente
8280/18	19/12/2018	3,15	3,62	Ausente
0045/19	03/01/2019	0,70	2,30	Ausente
0044/19	03/01/2019	0,70	2,87	Ausente

0065/19	03/01/2019	0,70	3,36	Ausente
0064/19	03/01/2019	0,70	3,38	Ausente
0063/19	03/01/2019	1,30	2,81	Ausente
0062/19	03/01/2019	1,30	3,11	Ausente
0066/19	03/01/2019	1,30	3,54	Ausente
0043/19	03/01/2019	1,40	2,75	Ausente
0042/19	03/01/2019	1,95	3,48	Ausente
0046/19	03/01/2019	2,11	3,63	Ausente
0338/19	15/01/2019	0,70	2,82	Ausente
0334/19	15/01/2019	1,30	2,54	Ausente
0336/19	15/01/2019	1,30	2,64	Ausente
0335/19	15/01/2019	1,30	2,68	Ausente
0337/19	15/01/2019	1,65	3,04	Ausente
0460/19	17/01/2019	1,40	3,40	Ausente
0463/19	17/01/2019	1,54	3,15	Ausente
0461/19	17/01/2019	1,83	3,76	Ausente
0462/19	17/01/2019	2,04	3,40	Ausente
0459/19	17/01/2019	2,04	3,46	Ausente
0808/19	30/01/2019	1,30	1,74	Ausente
0809/19	30/01/2019	1,30	2,15	Ausente
0811/19	30/01/2019	1,30	2,62	Ausente
0812/19	30/01/2019	1,30	2,87	Ausente
0818/19	30/01/2019	1,30	2,89	Ausente
819/19	30/01/2019	1,40	2,89	Ausente
820/19	30/01/2019	1,70	3,79	Ausente
0810/19	30/01/2019	1,86	3,57	Ausente
821/19	30/01/2019	1,96	3,76	Ausente
822/19	30/01/2019	2,26	3,15	Ausente
1063/19	11/02/2019	1,30	3,04	Ausente
1065/19	11/02/2019	1,30	3,11	Ausente
1061/19	11/02/2019	1,30	3,15	Ausente
1064/19	11/02/2019	1,40	3,30	Ausente
1062/19	11/02/2019	1,48	3,63	Ausente
1171/19	13/02/2019	0,70	0,90	Presente
1168/19	13/02/2019	1,30	2,86	Ausente
1172/19	13/02/2019	1,54	2,49	Presente
1170/19	13/02/2019	2,63	2,99	Presente
1169/19	13/02/2019	2,66	3,00	Presente
1531/19	27/02/2019	1,30	2,70	Presente
1528/19	27/02/2019	1,40	2,87	Ausente
1530/19	27/02/2019	1,65	3,23	Ausente
1529/19	27/02/2019	1,90	3,08	Presente
1540/19	27/02/2019	2,00	3,66	Ausente
1541/19	27/02/2019	2,11	3,65	Ausente
1542/19	27/02/2019	2,62	3,81	Ausente
1532/19	27/02/2019	2,81	3,58	Ausente
1538/19	27/02/2019	2,93	4,43	Ausente
1539/19	27/02/2019	2,93	4,46	Ausente
1820/19	12/03/2019	1,30	3,00	Ausente
1823/19	12/03/2019	1,30	3,00	Ausente

1822/19	12/03/2019	1,30	3,18	Ausente
1821/19	12/03/2019	1,60	3,83	Ausente
1824/19	12/03/2019	1,65	3,68	Ausente
1901/19	14/03/2019	0,70	2,85	Ausente
1903/19	14/03/2019	1,77	2,66	Ausente
1902/19	14/03/2019	1,81	3,08	Ausente
1904/19	14/03/2019	1,93	3,32	Ausente
1905/19	14/03/2019	2,62	3,58	Ausente
2339/19	27/03/2019	0,70	2,72	Presente
2338/19	27/03/2019	1,30	2,63	Presente
2335/19	27/03/2019	1,54	2,56	Presente
2336/19	27/03/2019	1,60	2,60	Presente
2348/19	27/03/2019	2,11	3,51	Ausente
2337/19	27/03/2019	2,20	3,20	Presente
2349/19	27/03/2019	2,56	3,71	Ausente
2346/19	27/03/2019	2,92	3,58	Ausente
2347/19	27/03/2019	2,93	3,87	Ausente
2345/19	27/03/2019	3,88	4,77	Ausente
2793/19	10/04/2019	1,30	2,11	Ausente
2796/19	10/04/2019	1,60	3,51	Presente
2792/19	10/04/2019	1,74	2,18	Ausente
2795/19	10/04/2019	1,81	3,15	Ausente
2805/19	10/04/2019	2,72	4,15	Ausente
2804/19	10/04/2019	2,79	4,04	Ausente
2794/19	10/04/2019	2,84	3,18	Ausente
2802/19	10/04/2019	2,87	4,48	Ausente
2803/19	10/04/2019	3,11	4,18	Presente
2806/19	10/04/2019	3,70	4,64	Ausente
3305/19	24/04/2019	0,70	2,40	Presente
3304/19	24/04/2019	1,30	2,15	Ausente
3301/19	24/04/2019	1,30	3,00	Ausente
3302/19	24/04/2019	1,74	2,64	Ausente
3303/19	24/04/2019	2,18	2,97	Ausente
3309/19	24/04/2019	2,30	3,84	Presente
3308/19	24/04/2019	2,58	4,00	Ausente
3310/19	24/04/2019	2,75	4,20	Presente
3307/19	24/04/2019	2,75	4,30	Ausente
3306/19	24/04/2019	3,18	4,36	Ausente
3723/19	08/05/2019	1,30	2,15	Ausente
3719/19	08/05/2019	1,30	3,04	Ausente
3721/19	08/05/2019	1,48	2,86	Ausente
3722/19	08/05/2019	2,08	3,04	Ausente
3728/18	08/05/2019	2,48	3,00	Ausente
3727/19	08/05/2019	2,64	3,04	Ausente
3726/19	08/05/2019	2,95	4,26	Ausente
3720/19	08/05/2019	3,00	3,71	Ausente
3724/19	08/05/2019	3,32	4,45	Ausente
3725/19	08/05/2019	3,36	4,36	Ausente
4265/19	22/05/2019	0,70	1,81	Ausente
4267/19	22/05/2019	0,70	2,26	Ausente

4268/19	22/05/2019	0,70	2,52	Ausente
4266/19	22/05/2019	1,30	1,70	Ausente
4269/19	22/05/2019	1,30	2,45	Ausente
4256/19	22/05/2019	2,40	4,11	Ausente
4259/19	22/05/2019	2,46	3,18	Ausente
4255/19	22/05/2019	2,56	4,20	Ausente
4258/19	22/05/2019	2,60	4,34	Ausente
4257/19	22/05/2019	2,92	4,72	Presente
4777/19	05/06/2019	0,70	2,41	Ausente
4780/19	05/06/2019	1,30	1,70	Presente
4776/19	05/06/2019	1,30	2,61	Ausente
4779/19	05/06/2019	1,30	2,66	Presente
4784/19	05/06/2019	1,30	3,15	Ausente
4783/19	05/06/2019	1,54	2,26	Ausente
4785/19	05/06/2019	1,54	2,45	Ausente
4781/19	05/06/2019	2,15	3,48	Ausente
4782/19	05/06/2019	2,18	3,89	Ausente
4778/19	05/06/2019	2,76	3,46	Ausente
5320/19	19/06/2019	0,70	2,15	Ausente
5319/19	19/06/2019	0,70	2,40	Ausente
5321/19	19/06/2019	1,30	2,98	Ausente
5327/19	19/06/2019	1,30	3,70	Ausente
5325/19	19/06/2019	1,60	3,04	Ausente
5322/19	19/06/2019	1,98	3,91	Ausente
5326/19	19/06/2019	2,23	3,04	Ausente
5328/19	19/06/2019	2,36	3,59	Ausente
5324/19	19/06/2019	2,72	4,26	Ausente
5323/19	19/06/2019	2,88	3,53	Ausente

